



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELORI MIEKO OIKAWA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL DE QUITOSANA E HETERORAMNANA
SULFATADA ESTIMULANDO CÉLULAS-TRONCO NA PRODUÇÃO DE MATRIZ
EXTRACELULAR**

CURITIBA

2017

ELORI MIEKO OIKAWA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL DE QUITOSANA E HETERORAMNANA
SULFATADA ESTIMULANDO CÉLULAS-TRONCO NA PRODUÇÃO DE MATRIZ
EXTRACELULAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Coorientador: Prof^a. Dra. Maria Eugênia D. Nosedá
Prof^a. Dra. Katherine A. T. de Carvalho

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Oikawa, Elori Mieko

Desenvolvimento de biomaterial de quitosana e heteroramnana sulfatada estimulando células-tronco na produção de matriz extracelular. / Elori Mieko Oikawa. – Curitiba, 2017.

210 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Miguel Daniel Nosedá

Co-orientadora: Maria Eugênia D. Nosedá

Co-orientadora: Katherine A. T. de Carvalho

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Hidrogel. 2. Quitosana. 3. Células-tronco. I. Título II. Nosedá, Miguel Daniel. III. Nosedá, Maria Eugênia Duarte. IV. Carvalho, Katherine Athayde Teixeira de. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 617.30028



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)
Código CAPES: 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ELORI MIEKO OIKAWA**, intitulada: "**Desenvolvimento de biomaterial de quitosana e heteroramnana sulfatada estimulando células-tronco na produção de matriz extracelular**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Junho de 2017.

MIGUEL DANIEL NOSEDA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

CÉLIA REGINA CAVICHILO FRANCO
Avaliador Externo (UFPR)

FRANCINE VALENGA
Avaliador Externo (PUC/PR)

KATHERINE ATHAYDE TEIXEIRA DE CARVALHO
Coorientador - Avaliador Externo (FPP)

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER
Avaliador Interno (UFPR)

Aos meus pais e a família
Oikawa, por todo o amor, união e
paciência devotado.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Miguel por aceitar-me como aluna e por todo o conhecimento transmitido, experiências, oportunidades, paciência e dedicação expendido durante estes dois anos de mestrado.

Às Professoras Katherine e Maria Eugênia pela coorientação, conhecimento e experiências compartilhadas.

À Professora Célia por toda a sua dedicação e ensinamento científico e da vida, e por todo o carinho e compreensão.

Ao curso da Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica e aos órgãos financiadores de pesquisa no Brasil pelo suporte (CNPq).

Aos professores e técnicos, em especial o Arquimedes, do Centro de RMN pela dedicação e análises realizadas.

À Eliz pelas análises de HPSEC, simpatia, compreensão e profissionalismo.

À Rosangela pelas análises de GC-MS.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, em especial o Deonir, por todo o suporte e análises realizadas.

Ao Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe e a equipe por todo o suporte técnico e colaboração no desenvolvimento da parte biológica deste projeto.

Ao Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, e a toda a equipe médica e de enfermeiros da Ala de Queimados, em especial a Cíntia, por toda a colaboração, respeito, paciência e dedicação durante a coleta das amostras.

Aos pacientes que confiaram e gentilmente doaram uma parte de si, reconhecendo o nosso trabalho e acreditando no desenvolvimento da ciência.

Aos colegas de laboratório 248 e E3, Amanda, André, Ba, Bianka, Dani, Diego, Estela, Ester, Fran, Jaque, Jeni, Liria, Lu, Lucas, Mari, Mi, Rafaéis, pelas conversas e ótimos momentos de descontração juntos, tornando o ambiente de trabalho mais agradável, além do suporte e auxílio diário, troca de conhecimento e experiências.

Aos colegas e amigos de laboratórios vizinhos pela agradável convivência, conselhos e casuais empréstimos pelo bem da ciência.

À Estela pela companhia, dicas e ajuda nas benditas análises de RMN e reações químicas!

À Amanda, Jeni e Fran, “mães conselheiras” do laboratório, pessoas de corações e mentes tão grandes, que difícil é explicar a sorte minha de escolher um laboratório

7x7 m² e ter três mulheres excepcionais e altamente profissionais neste espaço! Que sorte a minha!! Obrigada pela amizade!! Vocês estão no meu coração!!

À Esterzita, que apesar do seu tamanho, tem um coração grandão! Obrigada pela companhia, pelas travessuras e por me alimentar com suas gostosuras!!

À Mi, mesmo chegando recentemente e invadindo a minha bancada, já conseguiu invadir o meu coração com o seu jeito meigo e sua audácia de mulher!

Aos colegas de laboratório do IPPPP, Adri, Ana, Bassam, Bia, Camila, Daiany, Dilcele, Laire, Guilherme, Pri, Stefanne, Su, Thiago, Vane, pelas ótimas conversas e companhias, suporte e colaboração.

À Adri, Ana, Bassam, Pri, Cami, Daiany, Dilcele e Vane que me receberam de forma tão calorosa e gentil, sempre dispostos a ajudar! Que equipe!! Muito obrigada por tudo!

Às Amigas para Sempre, que apesar dos encontros poucos frequentes, quando acontecem, sempre são especiais e só confirmam o porquê desta amizade ser tão duradoura (quase 20 anos?!) e tão especial. Amo vocês!

À Daninha, que apesar da minha ausência nos últimos meses, sempre me entende e aconselha sabiamente. Sabe o quão é especial para mim né chuchu?! Obrigada pela amizade! Te amo!

À Milla, mesmo a 400 km de distância, é parceria para todas as horas!! Valeu guria, amo vc!

À Gabi pela parceria pedreira! Tamo junto!!

Ao Pelé, que mesmo em terras distantes, está sempre perto, apoiando e aconselhando da forma mais acolhedora e nobre que um ser humano é capaz. Amo você nego!

Ao meu primo querido Tomio, parceria das pedaladas e ondas, conselheiro (90% zoações e 10% sérias, sendo esta, realmente do fundo do coração). Te amo brow!!

À minha mãe Neusa, meu pai Nolio, e meus irmãos Yoshio e Takao, que além da paciência e do amor incondicional, me apoiam e dão forças para a realização dos meus sonhos. Amo vocês!

À yakusa Oikawa!! QUE FAMÍLIA!! Dizem que família a gente não escolhe, mas com certeza um ser maior selecionou dedo à dedo a minha!! Que a união, garra, e o espírito de alegria e juventude sempre esteja presente na yakusa Oikawa! Amo todos de coração!!

Por mais que tente expressar em palavras, elas nunca vão exprimir todo o sentimento de gratidão que tenho por todos que estiveram envolvidos nesta caminhada. Agradeço a oportunidade de conhecer pessoas especiais que querem fazer a diferença! Meu muito obrigada!

Amor, fé e atitude são os pilares que tangem a realização dos nossos sonhos. A realização delas só depende da forma e do modo como institucionalizamos cada pilar.

Elori Mieko Oikawa

RESUMO

A engenharia de tecidos é uma área da medicina regenerativa que vem ganhando destaque no desenvolvimento alternativo de tecidos e órgãos para transplantes, utilizando principalmente células-tronco e biomateriais. O objetivo da presente pesquisa foi o desenvolvimento de biomaterial a base de polissacarídeo, avaliando sua aplicação no cultivo de células-tronco mesenquimais. Os polissacarídeos utilizados foram a heteroramnana sulfatada (H), proveniente da macroalga verde *Gayralia brasiliensis*, e quitosana (Q). A heteroramnana foi obtida a partir da extração aquosa à quente da biomassa algal, e caracterizada por análises químicas e cromatográficas (Cromatografia Líquido-Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas e Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão Acoplada a Detectores de Índice de Refração Diferencial e Espalhamento de Luz Laser em Multiângulos) e métodos espectroscópicos (Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D e 2D, Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e RAMAN). A caracterização química e o grau de acetilação da quitosana foram determinados pelas análises de RMN—de ^1H e ^{13}C . Os hidrogéis foram desenvolvidos por complexação polieletrólito dos polissacarídeos heteroramnana:quitosana, analisando diferentes proporções H:Q. A composição química dos hidrogéis HQ foi avaliada por análises de FTIR, Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) e RAMAN, demonstrando a presença proporcional dos grupos funcionais $-\text{NH}_2$ e $-\text{OSO}_3^-$, e sua estabilidade térmica por análises termogravimétricas (TGA). Também foi determinada a capacidade de absorção de fluídos no período de 0,5 até 48 h, verificando-se uma capacidade de retenção de fluídos de 10x em relação à massa inicial. As características ultraestruturais do biomaterial foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo observados dois tipos de estruturas com características distintas, uma lisa homogênea, formada por lamelas sobrepostas, e outra, porosa flocular, formada por poros de diferentes diâmetros. Os hidrogéis (H:Q) 2:1 e 3:2 foram os que demonstraram as melhores características físico-químicas, sendo escolhidos para os ensaios biológicos com células-tronco. A avaliação do biomaterial produzido foi realizada *in vitro* com células-tronco mesenquimais isoladas do tecido adiposo humano (CTA). As CTA isoladas foram caracterizadas através de imunofenotipagem por citometria de fluxo. Uma vez caracterizadas, as CTA foram cultivadas sobre os hidrogéis nos períodos de 3, 21 e 90 dias, sendo observada a formação de agregados celulares em forma de esferoides. As análises de MEV e imunofluorescência por microscopia confocal a laser demonstraram que as células-tronco foram adsorvidas pelo hidrogel e que a capacidade de proliferação das mesmas foi mantida. A produção de uma extensa matriz extracelular também foi observada e caracterizada por imunofluorescência, evidenciando a presença da proteína de matriz fibronectina. Os hidrogéis produzidos a partir dos polissacarídeos heteroramnana e quitosana demonstram ter características singulares para potenciais aplicações terapêuticas na medicina regenerativa como carreadores de células-tronco e no reparo da matriz extracelular.

Palavras-chave: Hidrogel. Heteroramnana. Quitosana. Complexos Polieletrólitos. Células-tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo. Esferoide Celular.

ABSTRACT

Tissue engineering is a field of regenerative medicine that has been gaining prominence in the development of tissues and organs for transplant using mainly stem cells and biomaterials. The aim of this research was the development of a polysaccharide-made biomaterial and the study of its application in the culture of mesenchymal stem cells. Polysaccharides used were a sulfated heterorhamnan (H), derived from green algae *Gayralia brasiliensis*, and chitosan (Q). Heterorhamnan was obtained from algal biomass by hot water extraction, characterized by chemical and chromatographic analyses (Gas Chromatography Mass Spectrometry and High Performance Liquid Chromatography – Multi Angle Laser Light Scattering – Refractive Index Detector) and spectroscopic methods (1D and 2D Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and RAMAN). The chemical characterization and acetylation degree of chitosan were defined by ^1H and ^{13}C NMR analyses. Hydrogel development was carried out by polyelectrolyte complexation of polysaccharides Heterorhamnan:Chitosan, several H:Q proportions were analyzed. The HQ hydrogels chemical composition was evidenced by FTIR, RAMAN and Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) techniques, showing a proportional presence of $-\text{NH}_2$ and $-\text{OSO}_3^-$ functional groups, and the thermal stability by thermogravimetric analysis (TGA). Physico-chemical analyses were accomplished in order to verify the absorption capabilities of fluids in the period of 0.5 to 48 h; showing a retention fluid capacity of 10x. Ultrastructural characteristics of the biomaterial were analyzed by scanning electron microscopy (SEM), and two structures with distinct characteristics were evidenced, a homogeneous smooth structure, composed by superpose lamella, and a floccular porous structure, with pores of different diameter sizes. Hydrogels (H:Q) 2:1 and 3:2 were those that showed the best physico-chemical characteristics and were chosen for the biological assays with stem cells. The biomaterial developed was tested *in vitro* with mesenchymal stem cell from adipose human tissue (ASC). The isolated ASC were characterized by flow cytometry immunophenotyping. Once characterized ASC were cultivated on hydrogels for 3, 21 and 90 days, being evidenced a cell aggregate formation with spheroidal form. SEM and immunofluorescence confocal laser microscopy analyses showed the adsorption of stem cells into the hydrogel and the proliferation capabilities of cells were maintained. Production of an extensive extracellular matrix was also observed and characterized by immunofluorescence, evidencing the presence of fibronectin matrix protein. Hydrogels prepared from heterorhamnan and chitosan polysaccharides demonstrated singular characteristics with potential therapeutic applications in regenerative medicine for stem cells delivery and extracellular matrix repair.

Key-words: Hydrogel. Heterorhamnan. Chitosan. Polyelectrolyte Complex. Adipose Mesenchymal Stem Cell. Cellular Spheroid.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMATIZAÇÃO DO MODO DE FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS POLIELETRÓLITOS	37
FIGURA 2. FORMAÇÃO DE COMPLEXOS POLIELETRÓLITOS PELA TÉCNICA CAMADA SOB CAMADA.....	38
FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA TEÓRICA DE HETERORAMNANAS SULFATADAS.....	49
FIGURA 4. ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA OBTIDA À PARTIR DA DESACETILAÇÃO DA QUITINA	52
FIGURA 5. FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA MACROALGA VERDE <i>Gayralia brasiliensis</i>	76
FIGURA 6. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-RID DO EXTRATO Gb1 ..	80
FIGURA 7. ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DOS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>G. brasiliensis</i>	81
FIGURA 8. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO EXTRATO Gb1	82
FIGURA 9. ESPECTRO DE RMN 2D HSQC DO EXTRATO Gb1	83
FIGURA 10. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA QUITOSANA.....	84
FIGURA 11. ESPECTRO DE RMN 2D HSQC DA QUITOSANA	86
FIGURA 12. ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA HETERORAMNANA DO EXTRATO Gb1	88
FIGURA 13. ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA QUITOSANA	90
FIGURA 14. ESPECTRO DE INFRAVERMELHO POR RAMAN DA HETERORAMNANA DO EXTRATO Gb1	93
FIGURA 15. ESPECTRO DE INFRAVERMELHO POR RAMAN DA QUITOSANA.....	95
FIGURA 16. ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA QUITOSANA DEMARCANDO AS REGIÕES INTEGRADAS PARA O CÁLCULO DO GRAU DE ACETILAÇÃO (DA)	97
FIGURA 17. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA QUITOSANA DEMARCANDO AS REGIÕES INTEGRADAS PARA O CÁLCULO DO GRAU DE ACETILAÇÃO (DA)	98

FIGURA 18. FLUXOGRAMA DO DESENVOLVIMENTO DOS HIDROGÉIS A PARTIR DAS HETERORAMNANAS ISOLADAS DE <i>G. brasiliensis</i> COM A QUITOSANA	100
FIGURA 19. HIDROGÉIS FORMADOS POR DIFERENTES PROPORÇÕES DE HETERORAMNANA:QUITOSANA.....	101
FIGURA 20. HIDROGÉIS FORMADOS NAS PROPORÇÕES DE HETERORAMNANA:QUITOSANA 1:1, 1:3, 2:3 E 3:1 SECOS POR DIFERENTES METODOLOGIAS DE SECAGEM	102
FIGURA 21. HIDROGÉIS HQ 1:1, 1:3, 2:3 E 3:1 SECOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE SECAGEM E REIDRATADOS COM TAMPÃO PBS POR 48H.....	104
FIGURA 22. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL POR MEV DA SUPERFÍCIE DO HIDROGEL HQ 4:3	105
FIGURA 23. ASPECTO MACROSCÓPICO DOS HIDROGÉIS HQ SELECIONADOS PARA ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICAS.....	107
FIGURA 24. TERMOGRAVIMETRIA DOS POLISSACARÍDEOS HETERORAMNANA, QUITOSANA E DOS HIDROGÉIS H:Q.....	115
FIGURA 25. COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE FTIR DO HIDROGEL HQ 1:4 E DOS POLISSACARÍDEOS HETERORAMANA E QUITOSANA.....	119
FIGURA 26. ESPECTROS DE FTIR GERADOS A PARTIR DOS HIDROGÉIS HQ FORMADOS POR DIFERENTES PROPORÇÕES DE HETERORAMNANA E QUITOSANA	121
FIGURA 27. ESQUEMATIZAÇÃO ILUSTRANDO AS POSSÍVEIS INTERAÇÕES QUÍMICAS ENTRE OS GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NA HETERORAMNANA E QUITOSANA E ÁCIDO BÓRICO PARA A FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS POLIELETRÓLITOS	123
FIGURA 28. COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RAMAN DO HIDROGEL 4:1 E DOS POLISSACARÍDEOS HETERORAMANA E QUITOSANA.....	124
FIGURA 29. COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DE HETERORAMNANA, QUITOSANA E DOS SOBRENADANTES 1:4 E 1:5	125

FIGURA 30. COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DE HETERORAMNANA, QUITOSANA E DOS SOBRENADANTES 4:1 E 5:1	126
FIGURA 31. COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DE HETERORAMNANA, QUITOSANA E DOS SOBRENADANTES 3:2, 4:3, 5:3 E 5:4.....	127
FIGURA 32. COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DE HETERORAMNANA, QUITOSANA E DOS SOBRENADANTES 2:1 E 1:1	128
FIGURA 33. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-RID DOS SOBRENADANTES	129
FIGURA 34. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA ARQUITETURA SUPERFICIAL DOS HIDROGÉIS HQ EM MICROSCOPIA DE VARREDURA (MEV).....	133
FIGURA 35. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA ARQUITETURA INTERNA DOS HIDROGÉIS HQ EM MICROSCOPIA DE VARREDURA (MEV) DE QUEBRA.....	137
FIGURA 36. TOPOGRAFIA DOS POLISSACARÍDEOS HETERORAMNANA (A), QUITOSANA (B) E HIDROGÉIS HQ 2:1 (C) E 3:2 (D) EM PERSPECTIVA 3D POR ANÁLISES DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	141
FIGURA 37. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS À PARTIR DO TECIDO ADIPOSEO	143
FIGURA 38. HISTOGRAMA DA AMOSTRA A4	146
FIGURA 39. FORMAÇÃO DE AGREGADOS CELULARES NOS HIDROGÉIS HQ 2:1 E 3:2	150
FIGURA 40. FORMAÇÃO DOS ESFEROIDES NOS HIDROGÉIS HQ 2:1 OBSERVADOS POR ANÁLISES DE MEV.....	153
FIGURA 41. ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL DAS CTA CULTIVADAS SOBRE O HIDROGEL 3:2	156
FIGURA 42. AUTOFLUORESCÊNCIA EMITIDA PELOS HIDROGÉIS HQ QUANDO SUBMETIDOS À LASERES NA FAIXA DE LUZ VÍSEL	158

FIGURA 43. ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SOBRE O HIDROGEL 2:1 POR MICROSCOPIA DE VARREDURA	159
FIGURA 44. ANALISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SOBRE O HIDROGEL HQ 3:2 POR MICROSCOPIA DE VARREDURA	162
FIGURA 45. ANÁLISE DA MATRIZ EXTRACELULAR FORMADA PELAS CTA CULTIVADAS SOBRE O HIDROGEL HQ 3:2	164

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. PAINEL DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE UTILIZADOS PARA ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DAS CTM DE TECIDO ADIPOSEO.....	70
QUADRO 2. PAINEL DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE UTILIZADOS PARA ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DA MATRIZ EXTRACELULAR PRODUZIDA PELAS CTM DE TECIDO ADIPOSEO.....	73

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE FLUÍDOS DOS HIDROGÉIS HQ QUANDO RE-HIDRATADOS EM ÁGUA DESTILADA E TAMPÃO FOSFATO	111
GRÁFICO 2. COMPARAÇÃO DA RUGOSIDADE DA SUPERFÍCIE DOS HIDROGÉIS HQ 2:1 E 3:2 COM OS HIDROGÉIS DE HETERORAMNANA E QUITOSANA	142

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	TRABALHOS UTILIZANDO POLISSACARÍDEOS DE ALGAS MARINHAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS COM APLICAÇÕES NA ENGENHARIA DE TECIDOS	57
TABELA 2.	RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES BRUTAS DOS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>G. brasiliensis</i>	78
TABELA 3.	MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NOS EXTRATOS AQUOSOS ISOLADOS DE <i>G. brasiliensis</i>	79
TABELA 4.	DESLOCAMENTOS QUÍMICO DAS UNIDADES DE RAMNOSE DA HETERORAMNANA (Gb1) E DA QUITOSANA.....	87
TABELA 5.	ASSINALAMENTOS DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO E RAMAN DA QUITOSANA E HETERORAMNANA.....	92
TABELA 6.	RENDIMENTO DOS HIDROGÉIS FORMADOS NAS DIFERENTES PROPORÇÕES DE HETERORAMNANA:QUITOSANA	108
TABELA 7.	COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DETERMINADA POR EDS DOS HIDROGÉIS FORMADOS DE HETERORAMNANA:QUITOSANA (HQ)	116
TABELA 8.	MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DAS ESTRUTURAS LAMELARES E POROSAS FORMADAS NOS HIDROGÉIS DE HETERORAMNANA:QUITOSANA (H:Q)	140
TABELA 9.	CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS DE TECIDO ADIPOSEO UTILIZADAS PARA O ISOLAMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E RENDIMENTO CELULAR	144
TABELA 10.	EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE DAS CTA EM P4.	147
TABELA 11.	DIÂMETRO DOS ESFEROIDES FORMADOS NOS HIDROGÉIS HQ 2:1 E 3:2 DURANTE 21 DIAS DE CULTIVO	152

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTO	- Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
CTA	- Células-tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo
ASTM	- <i>American Standard Test Method</i>
BM-MSC	- Células-tronco da Medula Óssea
BSA	- Albumina de Soro Bovino
CD	- <i>Cluster of Differentiation</i>
CLG-EM	- Cromatografia Líquido-Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CPE	- Complexos Polieletrólitos
CSEM	- Crio-Microscopia Eletrônica
CTH	- Células-tronco hematopoiéticas
CTM	- Células-tronco Mesenquimais
CTA	- Células-Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo
D	- Dias de cultivo
DA	- Grau de Acetilação
DAPI	- 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
MEC	- Matriz Extracelular
EDS	- Espectroscopia de Energia Dispersiva
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	- Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
Gb	- Extrato aquoso de <i>Gayralia brasiliensis</i>
h	- Horas
HCl	- Ácido Clorídrico
HQ	- Hidrogel Heteroramnana:Qitosana
HPSEC	- Cromatografia de Alta Eficiência por Exclusão de Tamanho
HSQC	- <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
ISCT	- <i>International Society for Cellular Therapy</i>
kDa	- kiloDalton
M	- Meses de Cultivo
MALLS	- Detector de Espalhamento de Luz Laser em Multiângulos
MEV/SEM	- Microscopia Eletrônica de Varredura

MilliQ	- Água Ultra Pura
Min	- Minuto
OPTN	- <i>Organ Procurement and Transplantation Network</i>
PBS	- Tampão Fosfato Salino
PGA	- Ácido Poliglicólico
PGE	- Polietilenoglicol
PLA/PLLA	- Ácido Polilático
Psi	- Libra (Força por Polegada Quadrada)
PVA	- Polivinil Álcool
REDEALGAS-	Rede Nacional em Biotecnologia de Macroalgas Marinhas
RID	- Detector de Índice de Refração Diferencial
Rpm	- Rotação por minuto
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
rRNA	- Ácido Ribonucléico Ribossomal
SFB	- Soro Fetal Bovino
SVF	- Fração Vascular Estromal
TFA	- Ácido trifluoroacético
TGA	- Análises Termogravimétricas
TTS	- <i>The Council of The Transplantation Society</i>
UV	- Raios Ultravioletas
BaCl ₂	- Cloreto de Bário
BaSO ₄	- Sulfato de Bário
CH ₃ COOH	- Ácido Acético
CO ₂	- Dióxido de carbono
D ₂ O	- Água Deuterada
GlcNH ₂	- Unidades de Glucosamina
GlcNAc	- Unidades de Glucosamida
NaBH ₄	- Borohidreto de Sódio
NH ₂ ⁺	- Grupamento Amino
NaNO ₂	- Nitrito de Sódio
OSO ₃ ⁻	- Grupamento Sulfato
3D	- Estrutura Tridimensional

LISTA DE SÍMBOLOS

α - ligações do tipo alpha

β - ligações do tipo beta

$^{\circ}\text{C}$ - grau celsius

® ou TM - marca registrada

\int - Integral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	JUSTIFICATIVA	27
1.2	OBJETIVOS	28
1.2.1	Objetivos Específicos	28
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1	MEDICINA REGENERATIVA	29
2.1.1	Engenharia de Tecidos.....	31
2.1.1.1	Desenvolvimento de Biomateriais.....	32
2.1.1.1.1	Hidrogéis	34
2.1.1.1.2	Formação de Complexos Polieletrólitos (CPE).....	36
2.1.2	Terapia Celular.....	39
2.1.2.1	Células-Tronco	39
2.1.2.1.1	Células-Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo (CTA).....	42
2.2	ALGAS MARINHAS.....	44
2.2.1	Algas Verdes	47
2.2.1.1	<i>Gayralia brasiliensis</i>	48
2.2.1.1.1	Polissacarídeos Sulfatados	49
2.3	POLISSACARÍDEOS APLICADOS À MEDICINA REGENERATIVA	51
2.3.1	Quitosana.....	51
2.3.2	Aplicações de Polissacarídeos de Algas Marinhas na Área Biomédica ...	54
3	MATERIAL E MÉTODOS	58
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO	58
3.1.1	Extração dos Polissacarídeos	58
3.2	DESENVOLVIMENTO DOS HIDROGÉIS	59
3.3	MÉTODOS ANALÍTICOS	60
3.3.1	Dosagem de Carboidratos Totais	60
3.3.2	Dosagem de Proteínas Totais	60
3.3.3	Dosagem de Sulfato	60
3.3.4	Dosagem de Ácido Urônico	61
3.4	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA	61
3.4.1	Hidrólise Ácida Total.....	61
3.5	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	62

3.5.1	Cromatografia Líquido-Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CLG-EM).....	62
3.5.2	Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão (HPSEC) Acoplada a Detector de Índice de Refração Diferencial (RID) e Espalhamento de Luz em Multiângulos (MALLS)	63
3.6	MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	63
3.6.1	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	63
3.6.1.1	Técnicas de RMN Monodimensionais	64
3.6.1.1.1	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN de ¹³ C)	64
3.6.1.1.2	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹ H)	64
3.6.1.2	Técnicas de RMN Bidimensionais (RMN 2D)	64
3.6.1.2.1	HSQC (<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>).....	64
3.6.2	Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	65
3.6.3	Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	65
3.7	MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS	65
3.7.1	Termogravimetria (TGA).....	65
3.7.2	Capacidade de Absorção de Fluídos.....	66
3.8	ANÁLISES BIOLÓGICAS	66
3.8.1	Material Biológico	66
3.8.1.1	Isolamento de Células-tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo (CTA)..	66
3.8.1.2	Contagem de Células	67
3.8.1.3	Cultivo das CTA	68
3.8.1.4	Dissociação Enzimática e Expansão das CTA	68
3.8.1.5	Criopreservação	69
3.8.1.6	Descongelamento das CTA.....	69
3.8.1.7	Caracterização e Viabilidade das CTA por Análises Imunofenotípicas	70
3.8.2	Preparo dos Hidrogéis HQ	71
3.8.2.1	Análises de Viabilidade	72
3.8.2.2	Caracterização da Matriz Extracelular	72
3.9	ANÁLISES MICROSCÓPICAS.....	73
3.9.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	73
3.9.1.1	Fixação e Desidratação das Amostras	73
3.9.1.2	Ponto crítico e Metalização.....	74
3.9.2	Microscopia Confocal de Fluorescência por Varredura Laser.....	74

3.9.3	Raman.....	75
3.9.4	Microscopia de Força Atômica (AFM).....	75
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1	OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS.....	76
4.1.1	Extração e Obtenção dos Polissacarídeos de <i>G. brasiliensis</i>	76
4.1.1.1	Análise Química dos Extratos Polissacarídicos	77
4.1.1.2	Composição Monossacarídica dos Extratos Polissacarídicos.....	78
4.1.1.3	Análise por HPSEC-MALLS-IR dos Extratos Polissacarídicos.....	79
4.1.1.4	RMN de ¹³ C dos Extratos Polissacarídicos.....	80
4.1.2	Caracterização Química dos Polissacarídeos	81
4.1.2.1	Caracterização por RMN	81
4.1.2.1.1	Análise do Extrato Gb1.....	81
4.1.2.1.2	Análise da Quitosana	84
4.1.2.2	Caracterização por FTIR	88
4.1.2.2.1	Análise do Extrato Gb1.....	88
4.1.2.2.2	Análise da Quitosana	89
4.1.2.3	Caracterização por RAMAN	92
4.1.2.3.1	Análise do Extrato Gb1.....	92
4.1.2.3.2	Análise da Quitosana	94
4.1.2.4	Determinação do Grau de Acetilação (DA) da Quitosana.....	96
4.2	DESENVOLVIMENTO DOS HIDROGÉIS	100
4.2.1	Rendimento dos Hidrogéis HQ Formados	108
4.2.2	Caracterização Físico-Química dos Hidrogéis HQ.....	109
4.2.2.1	Capacidade de Absorção de Fluídos.....	110
4.2.2.2	Análises Termogravimétricas (TGA).....	112
4.2.3	Caracterização Química dos Hidrogéis HQ	116
4.2.3.1	Caracterização por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	116
4.2.3.2	Caracterização por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	118
4.2.3.3	Caracterização por Raman.....	123
4.2.4	Análise dos Sobrenadantes.....	125
4.2.4.1	Análise por Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H.....	125
4.2.4.2	Análise de Homogeneidade por HPSEC-MALLS-IR.....	128

4.2.5	Análise Ultraestrutural dos Hidrogéis HQ por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	130
4.2.5.1	Padrão Estrutural da Superfície dos Hidrogéis HQ.....	130
4.2.5.2	Análise Ultraestrutural da Arquitetura Interna dos Hidrogéis HQ em Microscopia de Varredura (MEV) por Congelamento e Quebra.....	135
4.2.6	Análise da Topografia e Rugosidade dos hidrogéis por Microscopia de Força Atômica	141
4.3	ANÁLISES BIOLÓGICAS	143
4.3.1	Rendimento Celular.....	144
4.3.2	Caracterização das CTA	145
4.3.2.1	Análise Imunofenotípica das CTA.....	145
4.3.3	Resposta Biológica das Células-Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo (CTA) sobre os Hidrogéis HQ 2:1 e 3:2	149
4.3.3.1	Viabilidade Celular	155
4.3.3.2	Análise Morfológica e Ultraestrutural das Células-Tronco Mesenquimais sobre os Hidrogéis HQ 2:1 e 3:2 Utilizando Microscopia de Varredura (MEV)	159
4.3.3.3	Caracterização da Matriz Extracelular (MEC)	163
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	166
6	CONCLUSÕES	168
6.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	168
	REFERÊNCIAS.....	169
	APÊNDICE A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	197
	APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TLCE).....	207

1 INTRODUÇÃO

Milhares de pessoas são afetadas diariamente devido a injúrias causadas por doenças ou traumas, resultando na necessidade de transplantes ou de próteses. Atualmente, são cerca de 122,5 mil pessoas no mundo que estão na fila de espera por algum tipo de órgão ou tecido para o transplante (OPTN, 2015), sendo que 26% são pacientes brasileiros (ABTO, 2015). Mesmo com a progressão da ciência no desenvolvimento de novas tecnologias, existe ainda muita dificuldade de se realizar o transplante para certos tipos de órgãos ou tecidos, seja pela indisponibilidade nos bancos de doação, ou pela incompatibilidade do doador com o receptor (ATALA, 2009; ORLANDO et al., 2011a). Neste aspecto, a medicina regenerativa é um ramo emergente da medicina com aplicações voltadas para a reparação e substituição ou regeneração de células, tecidos ou órgãos danificados. É uma área interdisciplinar que utiliza a combinação de diferentes abordagens, incluindo o uso de moléculas solúveis, terapia genética, transplante de células-tronco, engenharia de tecidos, bem como a reprogramação de células e tecidos (GREENWOOD et al., 2006; KEMP, 2016).

A engenharia de tecidos, em especial, vem demonstrando resultados promissores na medicina reabilitacional, área multidisciplinar que envolve a combinação de conhecimentos da engenharia, ciências da vida e de materiais, com o intuito de produzir tecidos funcionais e órgãos bioartificiais (LANGER et al., 1993; NEREM et al., 1995). Quanto ao desenvolvimento de biomateriais para a engenharia de tecidos, diversos estudos têm sido feitos a fim de descobrir moléculas que proporcionem um conjunto ideal, e que apresentem características semelhantes ao do tecido ou órgão em estudo. Para a seleção do material, critérios como a biocompatibilidade, bioestabilidade, biodegradabilidade, propriedades da superfície, o design higiênico, a transferência de massa, a toxicologia, o custo, e outras propriedades físicas, químicas e biológicas determinam o potencial do biomaterial (GROSSKINSKY, 2006; BRANDON et al., 2009; GARG; GOYAL, 2014; WEBBER et al., 2014; ZOHORA; AZIM, 2014).

Visto que a maior parte dos objetos envolvendo a sociedade atual é proveniente de matérias-primas não renováveis, e tendo conhecimento do seu

uso futuro limitado, a necessidade pela descoberta e criação de novas moléculas biorenováveis tem sido cada vez mais imposta pela sociedade atual. As algas estão presentes em abundância no meio ambiente marinho, e tem grande importância no encadeamento do ecossistema, principalmente como organismos fotossintetizantes e como fixadores de nitrogênio (CHUNG et al., 2011; KIM, 2016). Compostos isolados de algas marinhas já vêm tendo larga aplicação na indústria química e alimentícia, entretanto, na indústria biomédica, esses recursos, de uma forma geral, ainda estão em fase inicial de pesquisas (D'AYALA et al., 2008; LAURIENZO, 2010; KUNDU et al., 2013; FILOMENA et al., 2015; KIM et al., 2016). Neste sentido, tem-se a necessidade de aprofundar os estudos em moléculas naturais que apresentem características físico-químicas, biocompatíveis e com atividades biológicas significativas para a indústria biomédica.

A quitosana é o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza e apresenta alto grau de biodegradabilidade e biocompatibilidade no organismo animal, além de atividades biológicas hemostáticas e bactericidas (FRANCESKO et al., 2011). Na literatura, já existem diversas pesquisas envolvendo este polissacarídeo no desenvolvimento de biomateriais para a engenharia de tecidos (LI et al., 2015; ZHAO et al., 2015). Em contrapartida, os polissacarídeos heteroramnanas sulfatadas provenientes de algas verdes, apresentam uma estrutura complexa com alta sulfatação e demonstram atividades biológicas relevantes (CASSOLATO et al., 2008; ROPELLATO et al., 2015), no entanto, não há relatos de aplicações para fins na medicina regenerativa.

Na literatura atual, não existe nenhuma descrição do desenvolvimento de biomateriais a partir dos polissacarídeos heteroramnanas e quitosana. Visto que esses polissacarídeos apresentam alta atividade biológica e são biocompatíveis, o presente trabalho visa desenvolver biomateriais para a engenharia de tecidos, a partir dos polissacarídeos oriundos de algas verdes, especificamente heteroramnanas sulfatadas provenientes de espécies do gênero *Gayralia* com o polissacarídeo quitosana. A capacidade físico-química e biológica que essas moléculas apresentam como biomateriais será analisada através de experimentos *in vitro*, onde será explorada a interação com células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano.

1.1 JUSTIFICATIVA

A grande demanda por transplante de tecidos e órgãos é um problema que afeta a sociedade em geral, devido a indisponibilidade em bancos de doações, mas principalmente, a incompatibilidade imunohistológica existente entre o doador e o receptor, resultando no óbito de muitas pessoas que aguardam na fila de espera por um transplante (ATALA, 2009; ORLANDO et al., 2011a).

Outro fator impactante na sociedade atual é a busca por energia e produtos renováveis, que tem sido cada vez mais intensa no decorrer das décadas. Com a necessidade de substituir materiais sintéticos por moléculas provenientes da natureza, os polissacarídeos isolados de diferentes fontes naturais têm recebido grande destaque, dentre eles, as heteroramnanas sulfatadas produzidas por macroalgas verdes (D'AYALA et al., 2008; LAURIENZO, 2010; KUNDU et al., 2013; FERNANDES et al., 2014; FILOMENA et al., 2015; VENKATESAN et al., 2015; YU; GU, 2015; KIM, 2016). As heteroramnanas são polissacarídeos sulfatados e apresentam uma composição monossacarídica altamente diversificada, contendo carboidratos neutros, como ramnose, e açúcares ácidos, como ácido glucurônico e idurônico, além de grupos substituintes como os grupos sulfatos, gerando estruturas complexas e de alto poder biológico (CASSOLATO et al., 2008; ROPELLATO et al., 2015).

É importante destacar que, na literatura atual, ainda não foi descrito o desenvolvimento de biomateriais para a engenharia de tecidos utilizando heteroramnanas. Em comparação com outros polissacarídeos já descritos no desenvolvimento de biomateriais, como alginatos e carragenanas (MURAKAMI et al., 2010; MIHAILA et al., 2013; BIDARRA et al., 2014), provenientes de macroalgas marrons e vermelhas, respectivamente, é possível notar que as heteroramnanas são moléculas complexas com alto grau de sulfatação e ramificação. Muitos estudos já vêm demonstrando que essas características estão intimamente relacionadas com o potencial em atividades biológicas (ALBUQUERQUE et al., 2004; SILVA et al., 2005; YE et al., 2008; COSTA et al., 2010). Visto que os biomateriais desenvolvidos com os polissacarídeos de algas vermelhas e marrons já vêm apresentando resultados promissores, mas

que ainda carecem de algumas características específicas seja física, química ou biológica, tem-se a necessidade de aprimorar ou buscar por novas moléculas que forneçam todas essas características em um só conjunto. Neste sentido, acredita-se que a complexidade apresentada pelas heteroramnanas permitirá obter um biomaterial com características físico-químicas e biológicas relevantes para a medicina regenerativa.

1.2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver um biomaterial para a medicina regenerativa, através da interação entre heteroramnanas provenientes da macroalga verde *Gayralia brasiliensis* com quitosana, bem como avaliar se o biomaterial desenvolvido é biocompatível com células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTA).

1.2.1 Objetivos Específicos

- a) Desenvolver e caracterizar um biomaterial polissacarídico utilizando heteroramnanas sulfatadas de macroalga verde e quitosana;
- b) Determinar a estrutura química do biomaterial formado através de métodos químicos e espectroscópicos (EDS, RMN, FTIR, RAMAN);
- c) Determinar a estrutura e o padrão de polimerização do biomaterial formado através de análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de força atômica;
- d) Avaliar o comportamento de CTA sobre os biomateriais polissacarídicos, através de experimentos *in vitro* e análises de MEV e microscopia confocal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MEDICINA REGENERATIVA

O conhecimento sobre a capacidade de regeneração do corpo humano remonta a tempos antigos. Na mitologia grega, a compreensão sobre esse feito foi utilizada como forma de punição, quando Prometeu roubou o fogo dos deuses e o entregou aos mortais. Por esse motivo, Zeus castigou Prometeu, amarrando-o a uma rocha para que uma águia debicasse seu fígado diariamente, e no dia seguinte, quando o órgão estivesse regenerado, fosse comido novamente (KERENYI, 1997). É claro que não se pode basear em lendas históricas, mas seria um belo fenômeno biológico se o organismo reagisse de tal forma. Atualmente, tem-se o conhecimento de que o organismo naturalmente apresenta a capacidade de regeneração, entretanto, quando esta resposta regenerativa não é eficaz, ocorre a disfunção e insuficiência do órgão ou tecido de uma forma geral, e neste aspecto, a medicina regenerativa tem como objetivo tentar resolver esses problemas.

A prática da medicina regenerativa iniciou-se quando Alexis Carrel, considerado o pai do transplante de órgão inteiro e ganhador do Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1912, foi o primeiro a desenvolver uma técnica bem sucedida de transplante de anastomose arteriovenosa de uma extremidade à outra (DUTKOWSKI et al., 2008). Vinte anos mais tarde, Carrel desenvolveu uma "bomba de infusão" que permitia que os órgãos pudessem ser mantidos fora do corpo durante o transplante, um conceito que atualmente tem sido utilizado em biorreatores para os estudos em engenharia de tecidos (DUTKOWSKI et al., 2008; ORLANDO et al., 2011b). Os estudos visionários de Carrel sobre a cultura celular, preservação e crescimento de órgãos *ex vivo* eram conceitos antecipados àquela época, e foi somente no alvorecer do novo milênio, com o avanço da tecnologia, que o termo medicina regenerativa começou a surgir (ATALA, 2009).

Nos últimos 10 anos, a medicina regenerativa vem tendo maior aceitação por profissionais na área da saúde e do governo, e estima-se que investimentos neste ramo tenham movimentado em torno de 10 bilhões de dólares (KEMP, 2016). Na indústria de biomateriais, as estimativas são

promissoras, sendo projetadas para 2021 um rendimento aproximado de 53 bilhões de dólares (STEM CELLS, TISSUE ENGINEERING, BIOBANKING & CAR-T INDUSTRIES, 2017). Por ser um ramo emergente da medicina, ainda apresenta definições divergentes. Para Greenwood e colaboradores (2006), a medicina regenerativa envolve a interdisciplinariedade entre áreas, utilizando a combinação de diferentes abordagens que incluem o uso de moléculas solúveis, terapia genética, transplante de células-tronco, engenharia de tecidos, bem como a reprogramação de tipos de células e tecidos, com o intuito de reparar e substituir ou regenerar células, tecidos ou órgãos danificados. Para Mason e Dunnill (2008) a medicina regenerativa pode ser definida de modo mais simplificado, não incluindo abordagens como o uso de moléculas solúveis, terapia genética e engenharia de tecidos. O principal foco seria a regeneração através do uso de técnicas com células, entre elas as células-tronco. Deste modo, a definição da medicina regenerativa por Mason e Dunil (2008) é a substituição ou regeneração de células, tecidos ou órgãos humanos, com o intuito de restaurar ou estabelecer a função normal.

O avanço em ciências como a engenharia genética, biologia celular e molecular, imunologia e de materiais, vêm desempenhando um papel fundamental para o desenvolvimento da engenharia de tecidos e da medicina regenerativa (LANGER; TIRRELL, 2004; ATALA, 2009). Contudo, diariamente milhares de pessoas são afetadas devido a injúrias causadas por doenças ou traumas, resultando na necessidade por transplantes ou próteses. Essa dificuldade de se realizar o transplante para certos tipos de órgãos ou tecidos são causadas principalmente pela indisponibilidade nos bancos de doação, ou pela incompatibilidade do doador com o receptor. Consequentemente, estes fatores ocasionam na falta de algum tipo de tecido ou órgão para o transplante e geram uma fila de espera (ATALA, 2009; ORLANDO et al., 2011a).

Outro motivo que preocupa os representantes internacionais, e que de certa forma está intimamente relacionado com a carência de transplantes, é o tráfico comercial de órgãos, o chamado “turismo de transplante” (TTS, 1985; BUDIANI-SABERI; DELMONICO, 2008; COHEN, 2013). Estima-se que este mercado movimenta milhões de dólares anualmente, e o Brasil é citado como um dos principais “doadores” de órgãos neste comércio ilegal (SCHEPER-HUGHES, 2000; SHIMAZONO, 2007).

Após o breve relato apresentado de como surgiu, o desenvolvimento e as principais causas e consequências da medicina regenerativa, esta dissertação abordará o tema de acordo com a definição por Greenwood e colaboradores (2006), que inclui tópicos como a engenharia de tecidos, o desenvolvimento de biomateriais e a terapia celular.

2.1.1 Engenharia de Tecidos

A engenharia de tecidos é uma das áreas que envolve o grande ramo da medicina regenerativa, e tem como definição básica o desenvolvimento alternativo de tecidos e órgãos para o transplante (NEREM et al., 1995). É uma área multidisciplinar que envolve a combinação de conhecimentos da engenharia, ciência da vida e de materiais, com o intuito de produzir tecidos funcionais e órgãos bioartificiais (LANGER et al., 1993).

O primeiro biomaterial desenvolvido e aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) foi o TransCyte™ (*Advanced Tissue Sciences*, USA). O biomaterial consiste de uma rede polimérica que atua como matriz ou suporte (*scaffold*) para o desenvolvimento de fibroblastos que são isolados do prepúcio de humanos recém-nascidos. Essas células permanecem em cultivo por um período de duas semanas, onde irão se dividir e produzir fatores de crescimento, colágeno e outra proteínas, formando uma pele humana funcional. Este biomaterial é congelado, e então distribuído no mercado para ser aplicado no tratamento de queimaduras de segundo e terceiro grau (PARENTEAU, 1999).

Em 2003, o primeiro caso de transplante empregando um órgão bioartificial foi realizado em um paciente de 58 anos de idade que apresentava câncer na traquéia em estado terminal. A traquéia artificial produzida para o transplante foi desenvolvida através da descelularização do segmento jejuno proximal de suínos, e recoberto por fibroblastos isolados do próprio paciente (MACCHIARINI et al., 2004). Este e outros estudos de transplante de traquéia bioartificial demonstraram ser resultados promissores (MACCHIARINI et al., 2008; JUNGEBLUTH et al., 2011). No entanto, há controvérsias com relação as respostas destes biomateriais ao longo prazo (DELAERE; VAN RAEMDONCK, 2014), e, tratando-se de questões que envolvem a saúde pública, o produto

deve ser investigado a fundo, avaliado e aprovado por comitês especializados.

Outro caso de transplante de órgão bioartificial desenvolvido e implantado foi a bexiga. Pacientes com mielomeningocele e que apresentavam doenças na bexiga em estado final, foram submetidos ao transplante de biomateriais desenvolvidos a partir do colágeno e ácido poliglicólico. Células musculares e do urotélio foram isoladas dos próprios pacientes, e após expansão, foram semeadas no biomaterial desenvolvido para posterior implantação. Durante 46 meses decorridos do transplante, os pacientes foram acompanhados por diversos exames e análises e não demonstraram rejeição ao protótipo (ATALA et al., 2006). O desenvolvimento de órgãos bioartificiais também tem sido aplicado para outros tipos de tecidos, como do fígado (UYGUN et al., 2010; BAPTISTA et al., 2011), coração (OTT et al., 2008) e do pulmão (OTT et al., 2010; PETERSEN et al., 2010). Estes estudos ainda se encontram em fase de testes em modelo animal, mas já vêm demonstrando resultados promissores para a engenharia de tecidos.

De modo simplificado, o desenvolvimento de um dispositivo integrado implantável para a engenharia de tecidos apresenta três componentes principais: a matriz, as células e os fatores solúveis. Estes componentes, além de interagirem entre si formando um conjunto harmonioso, devem ter a mesma resposta de interação com o organismo (HOLZAPFEL et al., 2013; KUNDU et al., 2013; VASHIST; AHMAD, 2015). A matriz ou *scaffold* é o principal componente responsável para gerar uma interação ideal entre o dispositivo com o organismo, e nesse aspecto diversos fatores influenciam no êxito do dispositivo a ser desenvolvido, desde o material que será utilizado para a produção do implante, assim como as técnicas envolvidas na elaboração do mesmo.

2.1.1.1 Desenvolvimento de Biomateriais

Os biomateriais já são conhecidos de longa data na área biomédica, aplicados principalmente como implantes ortopédicos e próteses dentárias. Podem ser definidos como qualquer substância, excluindo-se alimentos ou medicamentos, que tenham contato com tecidos ou fluídos biológicos (PEPPAS; LANGER, 1994; LANGER; TIRRELL, 2004). Outra definição

utilizada para biomateriais é qualquer material desenvolvido para fins de reparação ou regeneração de alguma parte funcional do corpo (WILLIAMS, 1987; PARK; LAKES, 2007).

Para o desenvolvimento de biomateriais aplicados à engenharia de tecidos, diversos critérios são avaliados, como: a biocompatibilidade, bioestabilidade, biodegradabilidade, propriedades da superfície, o *design* higiênico, a transferência de massa, a toxicologia, o custo, e entre outras características. Estas e outras propriedades físicas, químicas e biológicas são avaliadas de acordo com a aplicabilidade do biomaterial, com a finalidade de classificar o potencial uso para a engenharia de tecidos (GROSSKINSKY, 2006; GARG; GOYAL, 2014; WEBBER et al., 2014; ZOHORA; AZIM, 2014).

No desenvolvimento de biomateriais, diversos fatores influenciam nas características finais do produto, em especial, a matéria-prima utilizada para o seu desenvolvimento. As matérias-primas são classificadas de acordo com a sua natureza, podendo pertencer ao grupo dos metais, das cerâmicas ou dos polímeros. As propriedades mecânicas e morfológicas da matéria-prima podem ter grande influência na aplicabilidade final do produto. Biomateriais desenvolvidos para a reparação óssea, geralmente são produzidos a partir de metais ou cerâmicas, visto as suas características de alto grau de resistência mecânica e a baixa biodegradabilidade, propriedades que são características do tecido ósseo (DAWSON et al., 2008; HOLZAPFEL et al., 2013). Dentre os biomateriais desenvolvidos a partir da cerâmica e do metal, o fosfato de cálcio e titânio, respectivamente, têm sido vastamente empregados em estudos clínicos (TOQUET et al., 1999; MAEDA et al., 2007)

Os biomateriais desenvolvidos a partir de polímeros geralmente são aplicados na reparação de tecidos epiteliais e conjuntivos, por fornecer características mecânicas de menor resistência e maior elasticidade, similares aos aspectos da matriz extracelular (DAWSON et al., 2008; HOLZAPFEL et al., 2013). Os polímeros podem ser obtidos naturalmente ou produzidos sinteticamente através de reações químicas específicas. Dentre os polímeros sintéticos, o ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), polietilenoglicol (PGE), e entre outros, vem sendo muito utilizados no desenvolvimento de biomateriais (LEVENBERG et al., 2003; LIN; ANSETH, 2009).

Os polímeros encontrados na natureza também são alvos de estudos

na engenharia de biomateriais, visto a facilidade de obtenção, mas principalmente por demonstrarem melhor interação com células, promovendo maior interação celular e desempenho do sistema biológico (KUNDU et al., 2013). Dentre as moléculas naturais, algumas são obtidas da própria matriz extracelular, como o colágeno, ácido hialurônico, glicosaminoglicanas, e outros provenientes da natureza, como a quitosana, seda, celulose, o alginato e entre tantas outras (SHI et al., 2006; ASHTON et al., 2007; GERECHT et al., 2007; ROCKWOOD et al., 2011).

Os biomateriais podem ser classificados em quatro tipos principais, conforme a natureza morfológica gerada e pelo propósito em que serão aplicados, podendo ser classificados como matriz porosa 3D, malhas de nanofibras, hidrogéis ou microesferas (GARG; GOYAL, 2014). Neste trabalho, os biomateriais desenvolvidos a partir da heteroramnana e quitosana apresentaram características de hidrogéis, como será descrito posteriormente, e neste aspecto, será definido como hidrogéis heteroramnana:quitosana (HQ).

2.1.1.1.1 Hidrogéis

Os hidrogéis são definidos como estruturas tridimensionais hidrofílicas que apresentam alta capacidade de absorção de fluídos, permanecendo insolúvel e mantendo sua integridade física e mecânica. São estruturas formadas a partir de reações físicas ou químicas de cross-linking de redes poliméricas (BRANDON et al., 2009; TELES et al., 2010; EL-SHERBINY; YACOUN, 2013). Em outra definição mais detalhada dada por Peppas e colaboradores (2000), os hidrogéis são estruturas poliméricas capazes de inchar-se com água e formadas a partir de diferentes tipos de ligações, que incluem: ligações covalentes produzidas a partir de reações de um ou mais comônômeros; emaranhamentos formados a partir de *cross-linking* físicos; ligações de hidrogênio ou interações de Van der Waals; interação de duas ou mais cadeias macromoleculares formando estruturas cristalinas.

A compreensão da estrutura e biologia do tecido nativo são fatores essenciais que podem influenciar no desenvolvimento de biomateriais mais precisos (LANGER; TIRRELL, 2004). Os hidrogéis são bastante estudados na engenharia de tecidos por apresentarem características estruturais singulares,

como uma superfície macia e a formação de estruturas porosas, permitindo uma alta capacidade de absorção de água e a insolubilidade a ela, além da entrada de pequenas moléculas (drogas e nutrientes) e a saída de resíduos, garantindo a manutenção de moléculas e uma funcionalidade similar ao tecidos biológico (HOARE et al., 2008; BIDARRA et al., 2014). Essas características físicas e mecânicas se assemelham a matriz extracelular (MEC), um dos principais substratos encontrados nos tecidos e órgãos do organismo. A MEC apresenta diferentes composições, densidades e estruturas, que variam entre os diferentes tipos de tecido. Além da presença de proteínas, glicoproteínas, polissacarídeos e proteoglicanos, que podem interagir com receptores de células e desencadear reações imunológicas e bioquímicas específicas (WEBBER et al., 2014).

Além das aplicações dos hidrogéis como *scaffold* para o desenvolvimento e reparação da matriz extracelular de diferentes tipos de tecidos (ósseo, cartilagem, epitelial, vascular, muscular, neural) (BRANDON et al., 2009), outras aplicações também vêm sendo investigada na literatura, como para carreadores de fármacos (BHATTARAI et al., 2010), membranas para barreiras imunológicas (WEST; HUBBELL, 1996), encapsulamento de células (MCGUIGAN; SEFTON, 2006), biosensores (HILT et al., 2003) e outros.

Os hidrogéis podem se apresentar de diversas formas, conforme os diferentes critérios estabelecidos durante o desenvolvimento dos biomateriais. Desta forma, os hidrogéis podem ser classificados de acordo com o modo de preparo, a natureza da matéria-prima utilizada, a carga iônica, o modo de resposta a estímulos, e entre outros aspectos (PATEL; MEQUANINT, 2011). O modo como os hidrogéis respondem a diferentes estímulos é um fator que tem grande impacto na estrutura do biomaterial, mas principalmente na aplicabilidade do mesmo. Os hidrogéis podem ser termo sensíveis, pH-sensível, sensível a glicose, à luz, à pressão, à antígenos, à enzimas, e outros fatores indutores (PEPPAS et al., 2000; PATEL; MEQUANINT, 2011).

Outra forma de classificar os hidrogéis é pelo método como foram desenvolvidos e é um fator que tem grande influência na estrutura e aplicabilidade do biomaterial. Na literatura, existem inúmeras técnicas que vêm sendo aplicadas, como por emulsificação (DANG et al., 2002), liofilização (RICCIARDI et al., 2005), impressão em 3D (MIRONOV et al., 2003),

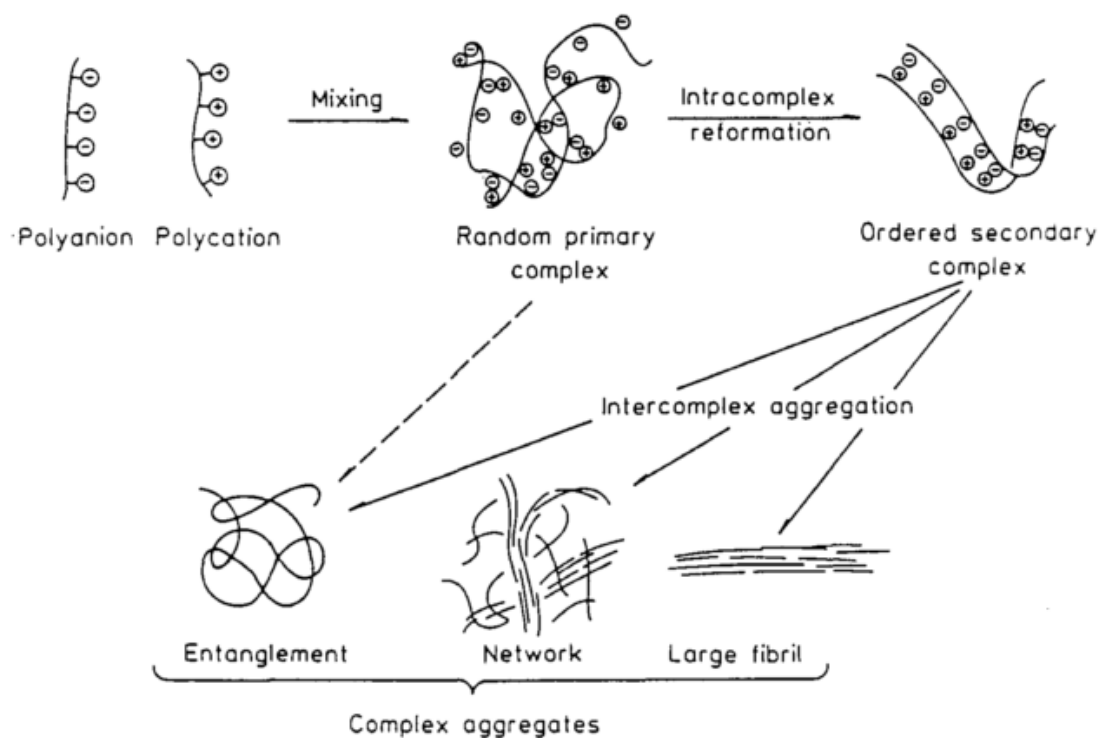
micromoldagem (YEH et al., 2006), fotolitografia (KOH et al., 2003), técnicas microfluídicas (TAN et al., 2004), e entre muitos outros. No presente trabalho, o desenvolvimento de hidrogéis à partir dos polissacarídeos heteroramnana e quitosana foi realizado através da formação de complexos polieletrólitos.

2.1.1.1.2 Formação de Complexos Polieletrólitos (CPE)

A metodologia empregada no desenvolvimento de biomateriais com diferentes polissacarídeos/polímeros é outro elemento importante que influencia nas características finais de um bioproduto. A complexação polieletrólito, é a formação de complexos formados a partir da interação de moléculas com cargas opostas, seja entre poliácidos e polibásicos, ou entre o metal neutralizado e sais halogenetos. Existem dois tipos de complexos polieletrólitos (CPE): o primeiro, relacionado com os CPE catiônicos e aniônicos; e o segundo, com os CPE catiônicos com tensoativos aniônicos ou complexos polieletrólitos aniônicos com tensoativos catiônicos (THÜNEMANN et al., 2004).

O modo como as estruturas são formadas a partir dos complexos polieletrólitos ainda é uma questão a ser entendida. Dois modelos principais têm sido propostos: o modelo da estrutura em escada, onde a formação do complexo ocorre através da adaptação conformacional a nível molecular; e o modelo de ovos mexidos, onde grande quantidade de cadeias são incorporadas em uma partícula (PHILIPP et al., 1989). De acordo com Tsuchida (1974), o desenvolvimento de complexos polieletrólitos ocorre inicialmente com a formação primária de complexos ligados por forças de Coulomb, de modo irregular e instantâneo. Esta primeira estrutura ocorre em baixas concentrações, como pequenas partículas, e não sofre precipitação. A segunda etapa ocorre a partir de uma hora de reação de interação entre os polieletrólitos, e envolve a formação de novas ligações e/ou a correção da distorção das cadeias poliméricas. A estrutura final do complexo polieletrólito formado vai ocorrer a partir da interação entre as estruturas secundárias formadas, de modo que a razão molar das unidades de repetição dos componentes poliméricos no agregado seja quase única, e insolúvel ao meio (Figura 1) (TSUCHIDA, 1994).

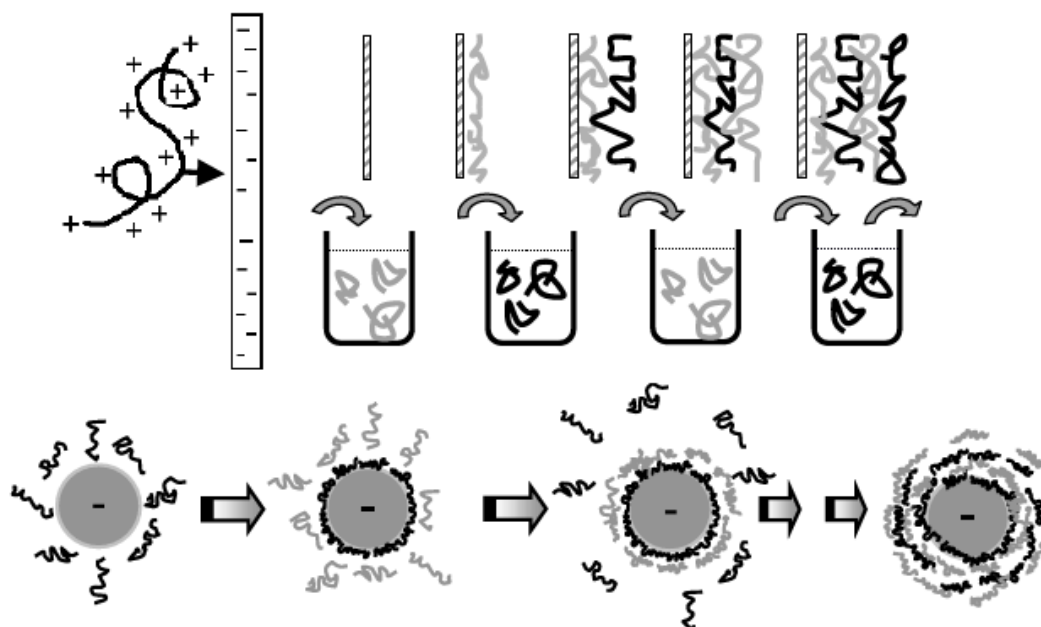
FIGURA 1. ESQUEMATIZAÇÃO DO MODO DE FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS POLIELETRÓLITOS



FONTE: TSUCHIDA (1994).

A formação dos CPE é demonstrada principalmente em reações em solução, no entanto, outras técnicas têm sido desenvolvidas, como camada sob camada (BERTRAND et al., 2000). Nas reações em solução, os polieletrólitos catiônicos e aniônicos se encontram dissolvidos, e quando a interação entre os dois blocos ocorre de forma simétrica, a precipitação do complexo polieletrólito é sucedida. Nas reações em camada, a primeira camada é obtida por adsorção e apresenta carga positiva ou negativa. A camada seguinte vai ser composta pelo polieletrólito com carga oposta a primeira, e assim, sucessivamente, até a formação do complexo polieletrólito (Figura 2).

FIGURA 2. FORMAÇÃO DE COMPLEXOS POLIELETRÓLITOS PELA TÉCNICA CAMADA SOB CAMADA



FONTE: SCHONHOFF (2003).

A formação dos complexos polieletrólitos pode ser influenciada por diversos parâmetros, como a força iônica, o pH do meio e a temperatura. Essas características permitem a formação de CPE com diferentes aspectos morfológicos e estruturais, incluindo a massa, o tamanho e a densidade estrutural (TSUCHIDA, 1994; THÜNEMANN et al., 2004). Tendo conhecimento de todos os parâmetros, o nível de agregação dos complexos pode ser controlado de acordo com a concentração dos componentes da solução polieletrólito. A densidade estrutural, que é recíproca ao grau de dilatação, pode ser influenciada pela densidade de carga dos polieletrólitos (DAUTZENBERG, 1997). Estes fatores permitem a obtenção de uma gama de complexos polieletrólitos, e por isso tem sido alvo de estudos para sistemas carreadores de fármacos, enzimas e ácido desoxirribonucléico (DNA), partículas que podem ser facilmente integradas no complexo.

O desenvolvimento de complexos polieletrólitos a partir de polissacarídeos tem sido alvo de estudos para a elaboração de novos biomateriais. Muitos estudos vêm utilizando a quitosana para desenvolver biomateriais a partir do processo de formação de complexos polieletrólitos, visto as propriedades catiônicas naturais que este polissacarídeo apresenta

(HAMMAN, 2010). Em alguns estudos utilizando esta metodologia, verificou-se a formação de biomateriais com estruturas menos rígidas e mais porosas (TOSKAS et al., 2012; LI et al., 2014).

Entre os métodos utilizados para o desenvolvimento de biomateriais, nota-se que muitos fazem o uso de agentes químicos para ligações cruzadas (*crosslinker*) (MIHAILA et al., 2013) ou por fatores externos, como a exposição a radiação ultravioleta (DASH et al., 2014). No geral, verifica-se que biomateriais desenvolvidos a partir de reações químicas induzidas, apresentam características mais compactas e resistentes. Enquanto que os biomateriais produzidos a partir da formação de complexos polieletrólitos ocorrem de forma espontânea, e apresentam características mais tênues e sensíveis à mudanças das condições do ambiente (BERGER et al., 2004). À longo prazo, essas características podem ser um fator influente na capacidade de biodegradabilidade do biomaterial quando *in vivo*, e conforme a aplicabilidade do mesmo, fatores como o método podem influenciar nas características finais do produto.

2.1.2 Terapia Celular

2.1.2.1 Células-Tronco

A terapia celular é outra linha da medicina regenerativa que vem demonstrando resultados promissores no tratamento de muitas doenças. O uso de células, em especial as células-tronco, é objeto de estudos em diversos centros de pesquisa ao redor do mundo. As células-tronco são células indiferenciadas, não especializadas e apresentam a capacidade de diferenciação e auto-renovação ilimitadas, podendo se transformar em múltiplos ou em todos os tipos celulares do organismo, sendo desde células da pele, coração, fígado e de todos os outros tecidos presentes no corpo (CAPLAN, 2007). Existem dois tipos principais de células-tronco: as embrionárias e as adultas. As células-tronco embrionárias são aquelas derivadas da massa celular interna do blastocisto, e tem o potencial para originar as três camadas germinativas, podendo formar um organismo totalmente funcional (ROBEY, 2000; CHAMBERS; SMITH, 2004). Estas células

são efêmeras e desaparecem poucos dias após a fertilização, e conforme a maturação, são direcionadas para a reprodução como linhagens germinativas ou para processos de organogênese na forma de células somáticas (ROBEY, 2000).

Após o nascimento, as células-tronco são encontradas em nichos celulares específicos, em estado quiescente ou em baixa proliferação, sendo essenciais para o desenvolvimento e a manutenção dos tecidos adultos. Estas células, denominadas células-tronco adultas, têm grande importância no processo de homeostase tecidual, dando suporte para a regeneração e substituição de células que sofreram morte natural por apoptose, ou devido a alguma injúria (PITTENGER et al., 1999; FUCHS; SEGRE, 2000; LI; XIE, 2005). Assim como as células-tronco embrionárias, as células-tronco adultas apresentam a atividade da telomerase, não estando, portanto, sujeitas à senescência celular, fenômeno que ocorre nas demais células somáticas diplóides, devido ao encurtamento do telômero após sucessivas mitoses (CHIU et al., 1996; PITTENGER et al., 1999). Desta forma, as células-tronco adultas mantêm suas características de auto-renovação ilimitada, e podem ser induzidas para um tipo de linhagem celular específico ou para múltiplas linhagens celulares (FUCHS; SEGRE, 2000).

Alguns estudos tem demonstrado que as células-tronco adultas estão relacionadas a atividades além das relacionadas na capacidade em regeneração e reparação de células. Propriedades como atividades imunomoduladoras, que incluem a supressão da proliferação e diferenciação de células *naïve* e de memória ($CD4^+$ e $CD8^+$), aumento da expansão de células T reguladoras, diminuição das características fenotípicas e funcionais das células dendríticas e a secreção de substâncias imunossupressoras (como óxido nítrico, prostaglandina E2, indoleamina 2,3-dioxigenase, e outros) (ZHAO et al., 2010), além de atividades relacionadas a inibição da apoptose e fibrose (LI et al., 2013; ZHOU et al., 2013).

As células-tronco adultas podem ser obtidas a partir de diferentes regiões do nosso organismo, sendo encontrados dois tipos principais: as células-tronco hematopoiéticas (CTH) que são responsáveis pela geração de todos os tipos celulares do tecido hematopoiético (LI; LI, 2006), e as células progenitoras mesenquimais (CTM), encontradas nas regiões estromais

(FRIEDENSTEIN et al., 1966; OWEN et al., 1995). Estas células representam uma fração bem pequena (0,001-0,01%) da população total de células nucleadas da medula óssea (PITTENGER et al., 1999), e mesmo assim, podem ser isoladas e expandidas com alta eficiência, e diferenciadas em diversas linhagens celulares.

No processo de isolamento das células-tronco mesenquimais, outros tipos de populações similares de células, como osteoblastos e osteócitos, podem ser isoladas juntamente com as CTM (KOLF et al., 2007). Na literatura, existem diversas informações divergentes com relação a caracterização destas células. De modo a definir e caracterizar as células-tronco mesenquimais, a *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) definiu três critérios para a sua classificação como células-tronco mesenquimais, sendo: 1) a capacidade de aderência ao plástico, 2) a expressão de antígenos específicos de superfície e 3) o potencial de diferenciação multipotente (DOMINICI et al., 2006). A capacidade de aderência ao plástico pode ser comprovada após 5 a 7 dias de cultivo *in vitro* em substratos de poliestireno tratados, sendo possível observar células com característica morfológica fibroblástica e o desenvolvimento de colônias simétricas (BOBIS et al., 2006).

Com relação a expressão de antígenos específicos de superfície para a caracterização das células-tronco mesenquimais, existe uma certa divergência na literatura. No entanto, a ISCT definiu como CTM as células que expressam os marcadores de superfície CD73, CD105 e CD90, e não apresentam expressão dos marcadores CD34, CD45, CD11b, CD14, CD79 α , CD19 e HLA classe II (DOMINICI et al., 2006). Existem outros marcadores adicionais que podem ser utilizados para dar mais confiabilidade na caracterização das células, como CD29, CD44, CD49a-f, CD146, CD166 e CD271 (KOLF et al., 2007; PHINNEY; PROCKOP, 2007), visto que o imunofenótipo das CTM é dinâmico e pode sofrer alterações da sua expressão ao longo do cultivo (MOSNA; SENSEBE, 2010).

O último critério utilizado pela ISCT para a caracterização das CTM é sua capacidade de diferenciação em pelo menos três linhagens celulares diferentes (DOMINICI et al., 2006). A partir do seu isolamento, as CTM podem ser expandidas *ex vivo* e induzidas a diferenciar-se tanto *in vivo* como *in vitro*, sendo já demonstrado a sua diferenciação em diferentes tipos celulares, desde

osteoblastos, condrócitos, adipócitos, fibroblastos, mioblastos, cardiomiócitos, hepatócitos, tenócitos, cenócitos, miotubos, astrócitos, células estromais de suporte e até mesmo neurônios (CONGET; MINGUELL, 1999; MAKINO et al., 1999; PITTENGER et al., 1999; MINGUELL, 2001; JIANG et al., 2002; XU et al., 2004; EGUSA et al., 2005).

Na literatura, existem diversos trabalhos demonstrando o isolamento das células-tronco mesenquimais de diferentes fontes, como da medula óssea (KUZNETSOV et al., 1997), sangue de cordão umbilical (LEE et al., 2004), placenta (BATTULA et al., 2007), endométrio (SCHWAB; GARGETT, 2007), polpa dentária (SHI; GRONTHOS, 2003), líquido sinovial (OGATA et al., 2015), assim como do tecido adiposo (ZUK et al., 2002). No presente trabalho, as CTM utilizadas foram isoladas do tecido adiposo de humanos.

2.1.2.1.1 Células-Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo (CTA)

O Brasil é o segundo colocado no ranking de países que mais realizam cirurgias plásticas, ficando atrás somente dos Estados Unidos (ISAPS, 2015). Em 2015, o procedimento cirúrgico mais realizado foi a lipoaspiração, aproximadamente 183 mil, seguido do processo cirúrgico para aumento de mama, cirurgia de pálpebra e abdominoplastia (ISAPS, 2016). Nos processos de lipoaspiração pode-se obter até 5 L de tecido adiposo (GIBAS-DORNA et al., 2015) e na abdominoplastia até 5 kg ou mais, números que variam muito de acordo com cada caso.

O tecido adiposo retirado das cirurgias plásticas é rotineiramente descartado. No entanto, este material tem sido alvo de estudos por muitos grupos de pesquisa na área da terapia celular por demonstrar a presença das CTM, e que poderiam ser aproveitadas com o intuito de aplicar na medicina regenerativa. Na literatura, as células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo são citadas de diversas formas, podendo ser encontradas como células-tronco adiposas/células estromais adiposas (ASC) (FRANQUESA et al., 2015), células-tronco adultas derivadas do tecido adiposo/células estromais adultas derivadas do tecido adiposo (ADSCs) (CAPLAN, 2007), células-tronco derivadas do tecido adiposo/células estromais derivadas do tecido adiposo (ATSC) (LEE et al., 2004), células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

(ATMSCs) (IM et al., 2005), lipoblasto/pericitos/pré-adipócitos/células processadas de lipoaspirado (PLA) (ZUK et al., 2002). As diferentes definições podem causar uma certa confusão com relação a sua classificação, para a Sociedade Internacional de Tecnologia Aplicada a Obesos, as células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo são classificadas com a nomenclatura de células-tronco adiposas (ASC) (BAER; GEIGER, 2012).

As pesquisas com células-tronco mesenquimais tem aumentado bastante nos últimos anos, no entanto, existem muitas informações divergentes e não esclarecidas a respeito dessas células e sua origem. Sabe-se que podem existir algumas diferenças entre CTM obtidas de diferentes fontes, seja, no imunofenótipo apresentado por elas, na capacidade proliferativa, no potencial de diferenciação, no perfil de expressão gênica, ou até mesmo em aplicações médicas específicas (STRIOGA et al., 2012). O tecido adiposo é composto majoritariamente por adipócitos (20-30%) e uma população heterogênea de células encontradas na fração vascular estromal (SVF). A SVF é isolada a partir da camada lipídica madura, onde se encontram as CTA (30-40%), células endoteliais vasculares, células musculares lisas, e outras células circulantes do sangue, como leucócitos e eritrócitos (SUGA et al., 2008).

Os primeiros estudos caracterizando as CTA demonstraram ser populações de células adultas multipotentes, e capazes de serem cultivadas e diferenciadas *in vitro* para adipócitos, condrócitos, osteócitos e miócitos (ZUK et al., 2002). Em estudos realizados por Lee e colaboradores (2004) foram realizadas análises comparativas de caracterização e expressão de células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo e da medula óssea. Os resultados demonstraram similariedade entre as populações de células a partir da expressão dos marcadores de superfície CD29, CD44, CD90, CD105, c-kit, HLA-DR, CD34 e CD14. Nas análises de expressão gênica dessas células, verificou-se que menos de 1% dos genes se expressam de forma diferente, suportando a hipótese deste e outros pesquisadores de que as células tronco de diferentes fontes são provenientes de um precursor comum (BIANCO et al., 2001; JIANG et al., 2002).

Em estudos mais recentes comparando as células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo com as da medula óssea (BM- MSC), as CTA têm demonstrado serem mais estáveis geneticamente e

morfologicamente quando mantidas em longos períodos de cultivo, apresentando menor taxa de senescência e uma alta capacidade proliferativa. Também observou-se que as CTA conseguem reter o potencial de diferenciação por longos períodos de cultivo em comparação as BM-MS (IZADPANA et al., 2006). Os estudos utilizando células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo têm demonstrado ser uma ótima ferramenta para aplicações na medicina regenerativa, no entanto, investigações mais à fundo devem ser realizadas, visto que existem muitas divergências de informações e fatos não esclarecidos (STRIOGA et al., 2012). A aplicação destas células já vêm sendo demonstrado em doenças como diabetes (TRINH et al., 2016), doenças cardíacas (SCHENKE-LAYLAND et al., 2010), ortopédicas (BLACK et al., 2007) e até mesmo em cirurgias plásticas (YOSHIMURA et al., 2008).

2.2 ALGAS MARINHAS

As algas marinhas pertencem a um grupo de organismo diversificado capazes de se adaptar a ambientes complexos com altas concentrações salinas, variações na temperatura e luminosidade (PLAZA et al., 2008). Esses organismos podem ser encontrados ao longo de todo o globo terrestre e tem um papel fundamental na manutenção do ecossistema, seja através, do habitat natural que elas propiciam para o desenvolvimento de outras espécies (YANG et al., 2015), ou como produtores primários realizando a reciclagem de dióxido de carbono (CO_2) através do processo de fotossíntese. As algas marinhas são responsáveis pela geração de diversos compostos orgânicos e por mais da metade da produção global de oxigênio (CHUNG et al., 2011; KIM, 2016).

As algas marinhas apresentam em sua composição diversas moléculas com valor nutricional, como vitaminas, proteínas e minerais, além de outros compostos orgânicos essenciais, como carboidratos, lipídios e fibras (YU; GU, 2015). O uso de algas para consumo alimentar já é uma prática conhecida de longa data, principalmente pelos asiáticos, mas além da importância como fonte de alimento e no fluxo de energia, esses organismos vêm ganhando destaque para aplicações na indústria química, farmacêutica, cosmética e alimentícia. A necessidade e preocupação atual por processos e produtos que

sejam renováveis e menos agressivos ao meio ambiente deu a oportunidade das pesquisas com algas marinhas se expandirem nestas áreas. É possível encontrar estudos demonstrando a aplicabilidade da biomassa de algas e seus compostos na produção de biocombustíveis (SANTHOSH-KUMAR et al., 2016; ZHAN et al., 2016), nanopartículas (SHARMA et al., 2016), enzimas e proteínas (MOGHARABIA; MOHAMMAD ALI, 2016), no tratamento de efluentes (FANG et al., 2016; WUANG et al., 2016), como biofixadores de CO₂ (MOREIRA; PIRES, 2016), biofertilizantes (WUANG et al., 2016), alimentos funcionais (PLAZA et al., 2008), assim como, com diferentes atividades biológicas (SAMARAKOON; JEON, 2012).

O Brasil apresenta uma extensa costa litorânea e exibe uma grande biodiversidade, entretanto, os estudos com algas são restritos, principalmente pela dificuldade de conceituar esses organismos e pelo baixo número de especialistas na área. O primeiro estudo aprofundado sobre algas marinhas macroscópicas bentônicas no Brasil foi realizado em meados de 1950 pelo pesquisador Ailthon Brandão Joly, onde 100 espécies obtidas na Baía de Santos e arredores foram identificadas e descritas (JOLY, 1957). Em 2005, foi criado o banco de dados brasileiro REDEALGAS (Rede Nacional em Biotecnologia de Macroalgas Marinhas), com o intuito de classificar e identificar as espécies nativas brasileiras (FERNANDES et al., 2014). Mais tarde, Menezes e colaboradores (2015) realizaram um estudo aprofundado atualizando o acervo brasileiro de espécies de algas e cianobactérias, e estimou-se aproximadamente 4.800 espécies descritas presentes nos biomas brasileiros.

O conceito de algas é um assunto que ainda gera divergência, principalmente devido a grandes variações de estrutura, formas de reprodução, histórico de vida, processos fisiológicos e ambientes em que se encontram (BICUDO et al., 2006). Para Bicudo e Menezes (2010), as algas são classificadas como organismos aquáticos fotossintéticos, compreendendo organismos uni ou pluricelulares e que podem variar de um micron (nas microalgas) a dezenas de metros de comprimento (nas macroalgas). Nas macroalgas a estrutura vegetativa é denominada talo, pelo fato de não apresentar caule, flor, fruto e semente, e sua estrutura de reprodução ser composta por esporângios ou gametângios desprovidos do envolvimento de

células estéreis. Já para Pedrini (2011), as algas são classificadas da mesma forma como descrita por Bicudo, porém incluindo somente os organismos avasculares. Por essa razão, é possível encontrar estes organismos em qualquer um dos seguintes reinos: Bacteria, Protozoa, Plantae e Chromista (GUIRY, 2012).

Tradicionalmente, a principal característica utilizada para distinguir os grupos taxonômicos (ordem, classe) tem sido feita através do nível de organização do talo (HOEK et al., 1995). Contudo, a classificação através do sequenciamento do DNA e marcadores moleculares são outras formas que têm sido cada vez mais utilizadas pelos ficologistas (SAUNDERS, 2005; HAMSHER et al., 2011). Nos estudos de evolução utilizando técnicas moleculares, as comparações entre espécies têm sido feitas através do sequenciamento de genes nucleares ou de componentes de ácido ribonucléico ribossomal (rRNA) citoplasmático. Os primeiros estudos demonstrando que as algas apresentam ligações filogenéticas com as plantas superiores foram baseados no estudo das sequências de rRNA 58S (HORI et al., 1985, HORI; OSAWA, 1987). Por esse gene apresentar uma sequência curta de nucleotídeos, outras moléculas, como 18S e 28S rRNA, com sequências variando de 2000 a 5000 nucleotídeos, tem sido utilizadas com o intuito de obter informações mais precisas (HOEK et al., 1995). A falta de exemplares fósseis é uma das dificuldades encontradas para a melhor compreensão da evolução das espécies de algas. Mesmo assim, as pesquisas com técnicas moleculares têm demonstrado que as algas e as plantas terrestres possuem um ancestral comum e vem sendo aceito por muitos pesquisadores (MISHLER et al., 1994; CHAPMAN et al., 1998).

A obtenção de dados superestimados é uma questão que tem sido bastante discutida na área ficológica, em decorrência da dificuldade em correlacionar as espécies identificadas morfológicamente no período em que não se utilizavam as técnicas moleculares (DE CLERCK et al., 2013). De acordo com estimativas realizadas por Guiry e colaboradores (2012), existem 72.500 espécies diferentes de algas marinhas ao redor do mundo. Com o intuito de solucionar este problema, foi criado o *AlgaeBase*, um banco de dados eletrônico público que correlaciona e centraliza o maior número de dados da

mesma espécie, tendo documentado 32.260 espécies diferentes de algas (GUIRY, 2012).

As algas também podem ser subclassificadas de acordo com a sua composição celular. Os organismos unicelulares desprovidos de estruturas de fixação são denominados de microalgas, e os pluricelulares que se encontram fixados a um substrato são denominados de macroalgas ou algas marinhas (KIM, 2016). Apesar de algumas espécies se apresentarem como unicelulares em determinada fase do ciclo celular, ainda são consideradas como macroalgas pelo fato de serem macroscópicas na sua fase adulta (HOEK et al., 1995). Dentro do grupo das macroalgas, estas são subdivididas em três grandes grupos, de acordo com a composição do pigmento celular: as algas verdes (Chlorophyta), as algas pardas ou marrons (Phaeophyceae) e as algas vermelhas (Rhodophyta) (LOBBAN et al., 2000; KIM, 2016).

2.2.1 Algas Verdes

As algas verdes estão incluídas no filo Chlorophyta e são caracterizadas por apresentar diferentes aspectos morfológicos, sendo subdivididos em seis classes: Prasinophyceae, Ulvophyceae, Trebouxiophyceae, Chlorophyceae, Chlorodendrophyceae e Pedinophyceae (LELIAERT et al., 2012).

As algas verdes apresentam muitas características que se assemelham com as de plantas terrestres (GRAHAM et al., 2011). A coloração esverdeada se deve a presença dos pigmentos clorofila a e b, carotenóide e xantofilas que ficam armazenados nos cloroplastos (LELIAERT et al., 2012; KIM, 2016). Algumas espécies apresentam pirenóides, estruturas responsáveis pela síntese de amido, encontradas dentro dos cloroplastos. A estrutura da parede celular, na maioria das espécies, é composta por uma matriz fibrilar de celulose.

Esses organismos podem ser encontrados em diversos ambientes, desde ambientes aquáticos à terrestres (LELIAERT et al., 2011). No Brasil, estão presentes em abundância por todo o litoral, estendendo-se desde a região nordeste até o sul, e apresentam uma grande variedade de espécies (RAMOS et al., 2015). Ao longo do território brasileiro, foram identificadas

aproximadamente 350 espécies diferentes de algas verdes pertencentes a classe Chlorophyceae (MENEZES et al., 2015).

2.2.1.1 *Gayralia brasiliensis*

Um dos polissacarídeos que será utilizado no presente trabalho foi isolado da macroalga verde *G. brasiliensis*. A referida espécie foi recentemente identificada no Paraná por Pellizzari e colaboradores (2013), e pode ser encontrada ao longo de toda a costa brasileira. A classificação taxonômica ainda gera divergências, alguns autores consideram esta espécie pertencente ao gênero *Monostroma* (CORDEIRO-MARINO et al., 1993; BRAGA et al., 1997), entretanto, para Pellizzari e colaboradores esta nova espécie e outras similares, como a *M. latissimum*, encaixam-se em um novo gênero denominado *Gayralia*.

A *G. brasiliensis* pode ser encontrada em manguezais, costas rochosas protegidas e estuários externos. Apresentam morfologia e anatomia vegetativa caracterizadas pela presença de talo monostromático, laminar, expandido e ausente de dentes marginais. A sua composição celular é formada majoritariamente por células uninucleadas com cloroplastos parietais e a presença de um ou dois pirenóides proeminentes. A reprodução é de forma assexuada, em ciclos repetidos, através da germinação de zoóides biflagelados formados a partir de lâminas gametofíticas, seguidos de divisões mitóticas consecutivas (PELLIZZARI et al., 2013).

A composição química de algas pode diferenciar-se entre os indivíduos devido a diversos fatores influentes, como o hábitat, maturidade e condições ambientais (ITO; HORI, 1989; ZUBIA et al., 2008). Os principais produtos naturais de algas marinhas estudadas no Brasil são polissacarídeos sulfatados, lectinas e terpenos (FERNANDES et al., 2014). No filo Chlorophyta, a composição química das algas é formada majoritariamente por polissacarídeos, variando de 40 a 54% da sua massa total (ITO; HORI, 1989). Essas moléculas estão presentes na estrutura da parede celular, assim como, na forma de estocagem (CHANDINI et al., 2008).

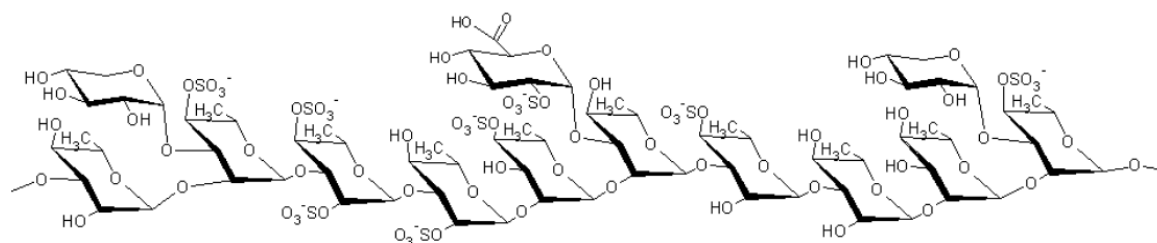
Em estudos preliminares com *G. brasiliensis*, os valores de carboidratos (45-70%) estão dentro do citado pela literatura (BERTE, 2013).

Esses polissacarídeos, denominados de heteroramnanas sulfatadas, apresentam uma estrutura química muito complexa, o que torna difícil a sua caracterização.

2.2.1.1.1 Polissacarídeos Sulfatados

As heteroramnanas sulfatadas foram evidenciadas primeiramente na espécie de alga verde *Gayralia oxysperma* (CASSOLATO et al., 2008), e também tem sido demonstrado em *G. brasiliensis* (BERTE, 2013). Este polissacarídeo apresenta em sua estrutura unidades monossacarídicas de ramnose, e em menor proporção glucose, xilose, galactose, manose e ácidos urônicos, além da presença de grupos sulfatos que estão dispostos ao longo da cadeia polissacarídica (Figura 3) (CASSOLATO et al., 2008; ROPELLATO et al., 2015).

FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA TEÓRICA DE HETERORAMNANAS SULFATADAS



FONTE: ROPELLATTO (2011).

Em pesquisas recentes desenvolvidas no Laboratório de Glicobiologia Estrutural de Carboidratos de Algas Marinhas da UFPR, Ropellato e colaboradores (2015) evidenciaram que as heteroramnanas da *G. oxysperma* são majoritariamente composta por unidades de α -L-ramnose ligadas, podendo apresentar sulfato em C-2 ou C-4, além de unidades de α -L-ramnose ligadas, podendo apresentar sulfato em C-4 ou C-3,4, em diferentes porcentagens. Nos estudos realizados pelo mesmo grupo de pesquisa demonstrou-se que essas moléculas apresentam diferentes atividades biológicas. As heteroramnanas provenientes da espécie *G. oxysperma* apresentam atividades antitumorais (ROPELLATO et al., 2015) e antivirais (CASSOLATO et al., 2008).

Em outras espécies de algas verdes pertencentes aos gêneros *Ulva* e *Enteromorpha* também é possível encontrar polissacarídeos sulfatados (LAHAYE et al., 1998). Os primeiros estudos envolvendo os polissacarídeos sulfatados de macroalgas verdes foram realizados em espécies do gênero *Ulva*. Nesses polissacarídeos, denominados ulvanas, foi possível determinar que os grupos sulfatos podem estar ligados em C-2 das unidades de ramnose (PERCIVAL; WOLD, 1963). Em muitas pesquisas essas moléculas estão sendo estudadas e tem-se verificado a capacidade em diversas atividades biológicas, como anticoagulante (AINOUZ et al., 1992; MAO et al., 2009; COSTA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012), antioxidante (QI et al., 2005; COSTA et al., 2010; MARTINS et al., 2012a), bactericida (VIEIRA et al., 1971; LIMA-FILHO et al., 2002), anti-proliferação (COSTA et al., 2010), anti-inflamatória (RODRIGUES et al., 2012), antiviral (SANTOS et al., 1999; NAGAOKA et al., 2003; MATTOS et al., 2011), citotóxicas (LHULLIER et al., 2006), imunomoduladoras (LEIRO et al., 2007), assim como propriedade anti-hiperlipidêmica (GORAD et al., 2009).

As atividades biológicas desses polissacarídeos sulfatados têm sido relacionadas com o teor de sulfato presente na molécula (COSTA et al., 2010). Apesar dessa relação entre a estrutura e as atividades biológicas não estar claramente estabelecida (BILAN et al., 2008), alguns autores sugerem que os grupamentos sulfatos tem a capacidade de interagir com proteínas catiônicas presentes na membrana celular (MULLOY, 2005), e outros, sugerem a importância do tamanho molecular desses polissacarídeos (ALBUQUERQUE et al., 2004; SILVA et al., 2005), estrutura química e a conformação dessas moléculas (YE et al., 2008).

A presença de grupos sulfatos na molécula também vem sendo correlacionada com a capacidade de diferenciar células-tronco. As fucoidanas, polissacarídeos sulfatado isolado de macroalgas pardas, mostrou-se capaz de promover a diferenciação de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e do fluído amniótico de humanos em células osteogênicas (PARK et al., 2012). Na literatura atual, não existe evidências sobre a capacidade que as heteroramnanas têm sobre a diferenciação de células-tronco mesenquimais.

Outra característica singular dos polissacarídeos sulfatados é a capacidade dessas moléculas formar géis. As ulvanas são afetadas pela

presença de ácido bórico e diferenças no pH, entretanto, ainda não se sabe quais são as condições específicas para que haja a formação dessas estruturas (HOLDT; KRAAN, 2011). Estudos realizados por Haug e colaboradores (1976) demonstraram que a presença de determinadas concentrações de borato e cálcio em água destilada, com pH similar ao da água do mar, permitem que estes polissacarídeos sulfatados formem estruturas gelatinosa. Os pesquisadores postulam que o borato se complexa as hidroxilas livres em C-2 ou C-3 das unidades de ramnose 1,4-ligadas, e o cálcio é responsável por estabilizar o complexo formado (HAUG et al., 1976).

2.3 POLISSACARÍDEOS APLICADOS À MEDICINA REGENERATIVA

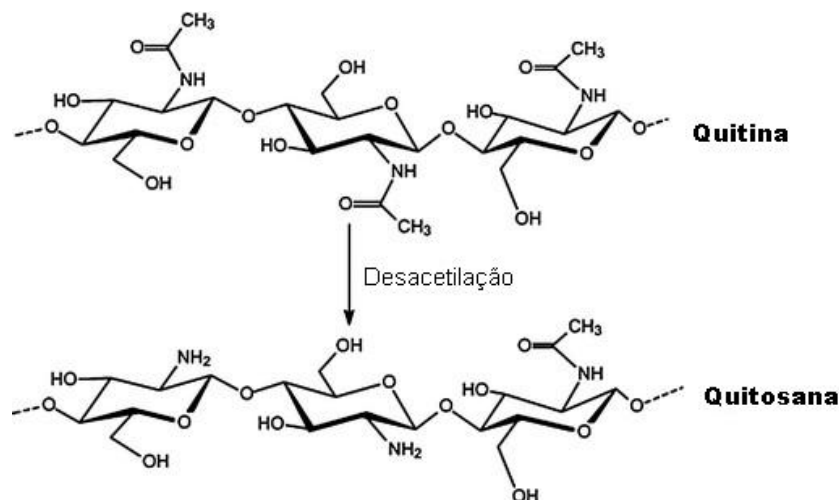
A busca por moléculas que forneçam atividades biológicas específicas e sejam biocompatíveis ao corpo humano tem sido cada vez mais recorrente na medicina regenerativa. Entre as moléculas que mais vem sendo desenvolvidas e utilizadas neste ramo, constata-se a descoberta de muitas provenientes da natureza. Alguns exemplos, como os polissacarídeos derivados de algas verdes (ALVES et al., 2012) e do exoesqueleto de artrópodes (SASHIWA et al., 2004), e proteínas presente nas teias de aranha (CHEN et al., 2002), mostram a grande importância que essas substâncias naturais podem ter quando direcionadas à engenharia de tecidos e a medicina regenerativa.

2.3.1 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo que vêm sendo empregado em estudos na engenharia de tecidos para aplicações regenerativas nas mais diversas áreas da medicina. É formada por unidades de β -D-glucosamina (1 \rightarrow 4)-ligada e pode ser obtida a partir da desacetilação da quitina (Figura 4), composto presente no exoesqueleto de artrópodes e na parede celular de fungos ou leveduras (YOUNES et al., 2015). A quitina, segundo biopolímero mais abundante encontrado na natureza, apresenta estrutura e funções bastante similares à celulose, se diferenciando, pela presença do grupo amino na posição C-2 das unidades de 2-desoxiglucose (RAVI KUMAR, 2000;

RINAUDO, 2006).

FIGURA 4. ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA OBTIDA À PARTIR DA DESACETILAÇÃO DA QUITINA



FONTE: ZUBER (2013).

A massa molecular e o grau de acetilação da quitosana são características que tem grande influência nas propriedades do polissacarídeo (RINAUDO, 2006). A solubilidade da quitosana, geralmente ocorre em condições ácidas, no entanto, conforme o modo como os grupos acetil estão dispostos ao longo da cadeia, a concentração iônica, o pH, a natureza do ácido utilizado para a protonação, e outros fatores, influenciam na solubilização da quitosana (AIBA, 1991). A solubilização deste polissacarídeo ocorre por meio da protonação do grupamento -NH_2 , convertendo-o em um polieletrólito em meio ácido. Esta característica faz da quitosana o único polissacarídeo com caráter catiônico encontrado na natureza (KUMAR et al., 2004; RINAUDO, 2006).

A força e a interação que as ligações da quitosana fornecem é outra propriedade importante desta molécula. Assim como a quitina, a quitosana é caracterizada como um polímero semi-rígido por apresentar uma estrutura molecular com extensão persistente. A rigidez da quitosana tem sido correlacionada com o grau de acetilação, e também com a conformação da molécula e as ligações intramoleculares de hidrogênio presentes. Essas características permitem a formação de materiais com diferentes formas, entre

fibras, filmes, hidrogéis e esponjas (RINAUDO, 2006). Em géis, verifica-se uma estrutura cristalina rígida, formada pelo rearranjo entre as hidroxilas e os grupos aminos, e quando em solução, a formação de microfibrilas formados a partir de ligações de hidrogênio (OHKAWA et al., 2004). Em biomateriais desenvolvidos a partir da quitina/quitosana observou-se estruturas com características porosas (LI et al., 2015; ZHAO et al., 2015).

Além dessas características, a quitosana também apresenta alto grau de biodegradabilidade e biocompatibilidade no organismo animal, além de atividades biológicas hemostáticas e bactericidas (FRANCESKO et al., 2011). Também foi demonstrado uma capacidade bioquímica significativa no processo de cicatrização, particularmente por acelerar a migração de macrófagos e a proliferação de fibroblastos, estimulando o processo de granulação e vascularização (MUZZARELLI, 2009).

Características e propriedades tão singulares fazem da quitosana uma molécula com alto potencial para ser aplicado na medicina regenerativa. A presença do grupo amino permite, além da interação com cargas opostas, diversas alterações químicas como a adição de cadeias poliméricas ou modificação enzimática, com o intuito de obter moléculas com propriedades e funções únicas (KUMAR et al., 2004; SASHIWA; AIBA, 2004; RANI et al., 2010; FRANCESKO; TZANOV, 2011). Alguns exemplos de aplicações utilizando a quitosana como carreadores de fármacos (HEJAZI; AMIJI, 2003; THEIN-HAN; STEVENS, 2004), lentes de contato (DE LA FUENTE et al., 2010), carreadores de gene (MUMPER et al., 1995;), e na engenharia de tecidos (KUMAR et al., 2004; SASHIWA; AIBA, 2004), especialmente para aplicações voltadas à regeneração óssea (PARK et al., 2005; PRZEKORA et al., 2014), dermal (RODRIGUES et al., 2008; ZHAO et al., 2015) e da cartilagem (KIM et al., 2003; HSU et al., 2004) já são demonstrados.

No mercado, já existem diversos produtos disponíveis à base de quitosana, como Chitosan Skin®, Chitopack C®, Chitoflex®, Chitodine®, HemCon®, e outros, voltados para aplicações em feridas epidermais, e que ajudam como bactericida e nos processos de coagulação e regeneração da pele (MUZZARELLI, 2009).

2.3.2 Aplicações de Polissacarídeos de Algas Marinhas na Área Biomédica

O uso de polissacarídeos de algas marinhas vem crescendo na indústria biomédica, e tem apresentado grande destaque como recurso para o desenvolvimento de biomateriais, particularmente pela diversidade química e biológica que apresentam (SILVA et al., 2012). Outras propriedades como a biocompatibilidade (LEE et al., 2012), biodegradabilidade (SILVA et al., 2012) e a formação de géis (D'AYALA et al., 2008) reforçam a importância dessas moléculas. A presença de grupos sulfatos em algumas espécies, é outro fator que desperta grande interesse dos pesquisadores. Apesar da falta de esclarecimento sobre a interação molecular que esses grupos provocam na matriz celular, estudos mostram a capacidade em promover a adesão, diferenciação e proliferação celular (HINTZE et al., 2014), além de estar relacionada com diferentes atividades biológicas (COSTA et al., 2010).

Na engenharia de tecidos já existem estudos demonstrando a potencialidade dos polissacarídeos de algas para a produção de hidrogéis/biofilmes (SANTO et al., 2009; TOSKAS et al., 2011; DASH et al., 2014; KIKIONIS et al., 2015). Os estudos desenvolvidos até o presente momento envolvem polissacarídeos simples, que apresentam uma estrutura repetitiva de unidades monossacarídicas, como os provenientes de algas vermelhas (ARAUJO et al., 2014) e pardas (MURAKAMI et al., 2010). Em compensação, os diferentes gêneros e espécies de algas verdes sintetizam polissacarídeos sulfatados distintos com uma composição de açúcares bem diversificada (PERCIVAL, 1979), e neste aspecto, a produção de hidrogéis ou biofilmes utilizando polissacarídeos complexos como as heteroramnanas ainda é uma área a ser investigada.

O alginato é um dos polissacarídeos mais difundidos no mercado e existem diversos estudos aplicados a engenharia de tecidos. Este polissacarídeo pode ser extraído a partir de algas marrons e tem a capacidade de formar estruturas geleificantes a partir de ligações de hidrogênio quando em pH baixo, ou através de interações iônicas na presença de íons di ou trivalentes, que atuam como *crosslinker* entre as cadeias dos polímeros (D'AYALA et al., 2008). A fucoidana é outro polissacarídeo obtido a partir das algas marrons, que vem chamando atenção por apresentar diversas atividades

biológicas que podem ser interessantes para aplicações na área biomédica. Murakami e colaboradores (2010) produziram um hidrogel a partir da fucoidana, alginato e quitosana, voltado para o tratamento de feridas dermais. Em testes *in vivo*, observou-se que o biomaterial desenvolvido estimulou uma rápida reparação do tecido epitelial em comparação ao controle, evidenciando, deste modo, um possível bioproduto para a medicina regenerativa.

Entre os polissacarídeos provenientes de alga vermelha, a carragenana tem sido muito investigada para o desenvolvimento de biomateriais. A diversidade de estruturas e a presença de grupamentos sulfato são uma das características que chamam a atenção dessas moléculas, além da capacidade em formar géis (VAN DE VELDE et al., 2002). Apesar do mecanismo de formação de géis não ser conhecido em detalhe, fatores como a alta capacidade de hidratação, o tipo estrutural, a temperatura, a concentração do polímero e a presença de cátions podem estar relacionado com esta propriedade (HARDING et al., 1997; TUVIKENE et al., 2008). No biomaterial produzido a partir da iota-carragenana com quitosana e gelatina, verificou-se a formação de biofilme com características porosas e eficientes na adesão, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano. O biomaterial demonstrou ser biocompatível e com capacidade de manter e diferenciar as CTM em células do tecido ósseo quando *in vitro* (LI et al., 2014).

Dos polissacarídeos de alga verde, a ulvana, proveniente do gênero *Ulva*, tem recebido grande atenção. Em alguns estudos, foram descrito a capacidade desses polissacarídeos em formar hidrogéis com características fibrosas (TOSKAS et al., 2011; KIKIONIS et al., 2015). Quando misturado com a quitosana, estes dois polissacarídeos formam um biomaterial com características bem peculiares, apresentando tanto fibras, quanto poros em sua estrutura, e alterando conforme diferentes concentrações de cada polissacarídeo (TOSKAS et al., 2012). Na literatura, já são descritos outras estruturas desenvolvidas a partir de ulvanas, na forma de nanofibras (TOSKAS et al., 2011), membranas (ALVES et al., 2012) e estruturas porosas 3D (ALVES et al., 2012).

A Tabela 1 cita alguns trabalhos sobre biomateriais desenvolvidos para a engenharia de tecidos a partir de polissacarídeos de algas marinhas, nela é

possível correlacionar informações como as metodologias utilizadas, as principais características físicas e biológicas obtidas e a aplicabilidade do biomaterial.

TABELA 1. TRABALHOS UTILIZANDO POLISSACARÍDEOS DE ALGAS MARINHAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS COM APLICAÇÕES NA ENGENHARIA DE TECIDOS.

Tipo de Biomaterial	Algas/ Polissacarídeos	Técnica utilizada para a formação do biomaterial	Análises utilizadas para a caracterização do biomaterial	Função/Ação	Referência Bibliográfica
Membrana	Ulvana/Quitosana (<i>Ulva rigida</i>)	Interação polieletrostática	-HPSEC, RMN, FTIR -SEM	Substrato para o cultivo de osteoblastos	Toskas et al., 2012
Suporte (Scaffold)	Iota-carragenana/ Quitosana/ Gelatina	Interação polieletrostática	-FTIR, DSC -SEM -Propriedades Mecânicas -Análises histológicas	<i>Scaffold</i> para diferenciação de células- tronco mesenquimais em osteócitos	Li et al., 2014
Hidrogel	Fucoidana/Quitosan a/ Alginato	Utilização de reagente para ligações cruzadas	-Testes <i>in vivo</i> -Análises histológicas	Hidrogel para cicatrização epidermal	Murakami et al.,2010
Hidrogel	Ulvana/ Fosfatase alcalina (<i>Ulva armoricana</i>)	Polimerização por UV	-SEM -RAMAN, RMN, FTIR -TGA -Difração por Raio X	Hidrogel para regeneração óssea	Dash et al., 2014
Hidrogel (Beads)	K-carragenana	Geleificação ionotrópica	-SEM -CSEM -FTIR -Propriedades Mecânicas	Hidrogel para distribuição de fatores bioativos (fatores de crescimento)	Santo et al., 2009
Suporte (Scaffold)	Ulvana (<i>Ulva lactuca</i>)	Utilização de reagente para ligações cruzadas (BDDE)	-FTIR -SEM - Microtomografia por Raio X -Propriedades Mecânicas	Substrato para o cultivo de fibroblastos	Alves et al., 2012
Hidrogel	K-Carragenana	Polimerização por UV (Metacrilção)	-RMN, FTIR -Propriedades Mecânicas -SEM	-Substrato para o cultivo de fibroblastos - <i>Beads</i> para encapsulação de células	Mihaila et al., 2013

HPSEC (Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão), RMN (Ressonância Magnética Nuclear), FTIR (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier), DSC (Calorímetro Diferencial de Varredura), SEM (Microscopia Eletrônica de Varredura), CSEM (Crio-Microscopia Eletrônica), TGA (Análises Termogravimétricas).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Exemplares da alga verde *Gayralia brasiliensis*, pertencentes à divisão Chlorophyta, classe Ulvophyceae, ordem Ulvales, família Gayraliaceae, foram coletados em substrato rochosos, em Setembro de 2012, na Baía de Guaratuba ($-25^{\circ} 52' 90''$ S, $-48^{\circ} 34' 58''$ O), no estado do Paraná, Brasil. Os exemplares foram identificados taxonomicamente pela Profa. Dra. Franciane M. Pellizzari, da Universidade Estadual do Paraná.

As amostras foram lavadas em água doce corrente, secas em estufa a 35°C , moídas (IKA® A11 Basic), liofilizadas e armazenadas a -20°C .

A quitosana com aproximadamente 85% de desacetilação foi obtida comercialmente (Sigma Aldrich).

3.1.1 Extração dos Polissacarídeos

A alga foi submetida ao processo de extração aquosa para o isolamento dos polissacarídeos conforme metodologia descrita por Ropellato e colaboradores (2015) com adaptações.

A alga seca e moída (33,74 g) foi submetida a cinco extrações sequenciais com água na proporção de 5% m/v. Durante 4 h, a solução foi mantida sob agitação mecânica constante em banho maria a 80°C . O extrato foi centrifugado (3500 rpm, 20 min, 5°C), gerando um precipitado (biomassa residual) e sobrenadante. A biomassa residual foi submetida a mais 4 ciclos de extração aquosa, como descrito acima, e os sobrenadantes foram concentrados em evaporador rotativo a baixa pressão. Para a precipitação dos polissacarídeos, os sobrenadantes concentrados foram tratados com etanol absoluto na proporção de 3:1 v/v e acetato de potássio, e mantidas *overnight* a 4°C .

Após a precipitação dos polissacarídeos, os extratos tratados com etanol foram centrifugados (3500 rpm, 30 min, 4°C), gerando o sobrenadante e o precipitado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressolubilizado em água destilada. Para a retirada do sal e traços de etanol, a solução foi dialisada em membrana de celulose (cut-off 12-14 kDa) contra água destilada. O controle da

diálise foi realizado através da determinação da condutividade das águas de diálise com condutivímetro modelo Lutron CD-4301 (Marca Instrutherm). A solução manteve-se em diálise até a água destilada apresentar os seus valores de condutividade padrão (aproximadamente 2-5 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Após diálise, os polissacarídeos foram liofilizados e nomeados utilizando código alfanumérico de acordo com as iniciais da espécie (G = *Gayralia*, b = *brasiliensis*) e o número indicando cada uma das cinco extrações (Gb1, Gb2, Gb3, Gb3A, Gb4 e Gb5, respectivamente). A biomassa residual de alga, gerada após as extrações aquosas (10,92 g) foi liofilizada e armazenada a -20°C , para possíveis futuros estudos.

3.2 DESENVOLVIMENTO DOS HIDROGÉIS

Para o desenvolvimento dos hidrogéis foram utilizados os polissacarídeos heteroramnana do extrato Gb1 isolados de *G. brasiliensis* (como descrito na seção anterior) e quitosana (Sigma Aldrich). A elaboração do biomaterial foi de acordo com a metodologia descrita por Toskas e colaboradores (2012) com adaptações. Primeiramente, cada polissacarídeo foi solubilizado na concentração de 1% m/v em soluções ácidas (pH 2) contendo 20 mMol de ácido bórico e 1 M de ácido acético. Em seguida, as soluções foram misturadas em diferentes proporções de heteroramnana:quitosana (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 2:3, 2:5, 3:1, 3:2, 3:4, 3:5, 4:1, 4:3, 4:5, 5:1, 5:2, 5:3, 5:4) e mantidas sob agitação mecânica magnética durante 4 h. Após a formação dos hidrogéis, as amostras foram submetidas a centrifugação (3500 rpm, 20 min, 4°C) gerando sobrenadante e precipitado. Os sobrenadantes gerados foram liofilizados e estocados a -20°C para posterior análises. Os precipitados contendo os hidrogéis foram transferidos para placas de Petri, e secos em estufa a vácuo (EDGON 5P) a 25 psi por 12 h. Os hidrogéis secos, denominados de hidrogéis HQ conforme a proporção de heteroramnana:quitosana, foram mantidos em dessecador sob vácuo, com sílica, para posterior análises.

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1 Dosagem de Carboidratos Totais

As dosagens de carboidratos totais foram realizadas pelo método colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Este método apresenta sensibilidade na faixa entre 10 – 80 µg de açúcar. As amostras foram diluídas em água destilada na concentração de 1 mg/mL, e para a dosagem foi utilizado 50 µL desta solução. As curvas-padrão foram repetidas a cada dosagem utilizando-se como padrão ramnose em concentrações de 10, 30, 50, 70 e 80 µg de açúcar. As amostras e os padrões foram preparados em triplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (SP-1105), no comprimento de onda de 490 nm.

3.3.2 Dosagem de Proteínas Totais

As dosagens de proteínas totais foram realizadas segundo o método colorimétrico de Lowry et al. (1951), utilizando o reativo Folin-Ciocalteu. Esse método apresenta sensibilidade na faixa entre 5 – 100 µg de proteínas. As amostras foram diluídas em água destilada na concentração de 1 mg/mL, e para a dosagem foram utilizado 500 µL desta solução. As curvas-padrão foram estabelecidas a cada dosagem utilizando-se como padrão soro-albumina bovina cristalina em concentrações equivalentes a 10, 20, 40, 60 e 80 µg de proteína. As amostras e padrões foram preparadas em triplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (SP-1105), no comprimento de onda de 660 nm.

3.3.3 Dosagem de Sulfato

Os teores de sulfato foram determinados conforme o método turbidimétrico descrito por Dodgson e Price (1962), utilizando como reagente a mistura gelatina-bário. O método apresenta sensibilidade na faixa entre 20 – 200 µg de sulfato. As amostras foram pesadas em quantidades variando entre 2 a 4 mg, solubilizadas em 1 mL de TFA 1 M e mantidas a 120°C durante 4 h para a hidrólise total dos polissacarídeos. Os valores das massas pesadas foram anotados para a determinação da porcentagem de sulfato depois da dosagem. Após a hidrólise total

dos polissacarídeos, os grupamentos sulfato são liberados, e quando entram em contato com o íon bário (adicionado na solução como cloreto de bário-BaCl₂), forma-se o sal insolúvel sulfato de bário (BaSO₄). O BaSO₄ fica suspenso no fluido gelatinoso, resultando na turbidez do meio reacional.

As curvas-padrão foram estabelecidas a cada dosagem utilizando-se como padrão sulfato de sódio em concentrações equivalentes a 30, 60, 90, 120 e 150 µg. O padrão utilizado consiste em uma solução de sulfato de sódio diluída em HCl 1 M, na concentração 1 mg/mL. As amostras e os padrões foram organizados em triplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (SP-1105) no comprimento de onda de 360 nm.

3.3.4 Dosagem de Ácido Urônico

Os teores de ácido urônico foram determinados segundo o método colorimétrico descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), utilizando o reagente m-hidroxibifenila. O método apresenta sensibilidade na faixa entre 1 – 38 µg de ácidos urônicos. As amostras foram diluídas em água destilada na concentração de 1 mg/mL, e para a dosagem foram utilizados 500 µL desta solução. As curvas padrão foram estabelecidas a cada dosagem utilizando-se como padrão uma solução de ácido glucurônico 100 µg/mL em concentrações equivalentes a 10, 20, 40, 60 e 80 µg. As amostras e padrões foram preparadas em triplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (SP-1105), no comprimento de onda de 525 nm.

3.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

3.4.1 Hidrólise Ácida Total

Para a determinação da composição monossacarídica dos polissacarídeos da macroalga *G. brasiliensis*, foi realizada a hidrólise ácida total dos extratos. As amostras foram pesadas em quantidades variando entre 1 a 2 mg, solubilizadas em 500 µL de TFA 1 M e mantidas a 100°C durante 4 h. Após a hidrólise ácida total, o ácido TFA foi evaporado sob ar comprimido, e o hidrolisado ressolubilizado em 500 µL de água destilada. Em seguida, os monossacarídeos livres foram reduzidos com borohidreto de sódio (NaBH₄) a temperatura ambiente, *overnight*. Após a reação de

redução, as amostras foram tratadas com ácido acético diluído (até pH 5), transformando o excesso de NaBH_4 em ácido bórico. O material foi novamente seco em ar comprimido, e a remoção do ácido bórico foi realizada através da co-destilação com metanol (3x) na forma volátil de borato de trimetila. Os alditóis formados foram acetilados com anidrido acético (500 μL) em estufa a 120 °C por 1 hora.

Seguida a reação de acetilação, as amostras na forma de acetato alditóis foram extraídas em clorofórmio. Para a retirada de ácidos e sais formados durante a reação, foram realizadas sucessivas lavagens com bicarbonato de sódio e água até a neutralização do meio. Após a evaporação do clorofórmio, os acetatos de alditóis formados foram analisados por Cromatografia Líquido-Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CLG-EM).

3.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.5.1 Cromatografia Líquido-Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CLG-EM)

As análises CLG-EM foram realizadas em cromatógrafo a gás da marca Varian 3800, equipado com coluna capilar de dimetil polissiloxano (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μm) VF-1ms (Factor Four Capillary Column) e um espectrômetro de massas do tipo *Ion Trap* (Varian Saturn 2000R), situados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. A temperatura inicial do forno foi de 50°C e do injetor foi de 250°C, seguido de aumento gradual de 40°C por min e chegando até 220°C para análise dos acetatos de alditóis, mantendo-se constante a partir de 25 min. Utilizou-se como gás de arraste o gás hélio com fluxo de 1,0 mL/min. Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons a 70 eV, com m/z (relação massa/carga) de 80 a 220. Os cromatogramas foram analisados e integrados em *software* Saturn Workstation 5.1. Esse método foi utilizado para quantificação relativa de acetatos de alditóis, sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons (JANSSON et al., 1976) e comparados com padrões produzidos por Sassaki e colaboradores (2005).

3.5.2 Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão (HPSEC) Acoplada a Detector de Índice de Refração Diferencial (RID) e Espalhamento de Luz em Multiângulos (MALLS)

Para as análises de homogeneidade foram preparadas soluções dos polissacarídeos na concentração de 1 mg/mL em solução de nitrito de sódio (NaNO_2 0,1 M) contendo azida de sódio (200 ppm) dissolvidas em água ultra pura (MilliQ). As soluções obtidas foram filtradas em membranas de acetato de celulose 0,22 μm (MILLIPORE).

As análises foram realizadas no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração diferencial (RID) WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WAYTT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP, com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Utilizaram-se quatro colunas de gel permeação WATERS, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 (Colunas ultrahydrogeltm 2000, 500, 250 e 120, respectivamente) em série. O eluente utilizado foi uma solução de NaNO_2 0,1 M contendo azida de sódio (200 ppm) e pressão de 920 psi a 20°C.

3.6 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

3.6.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear mono e bidimensionais foram realizadas no Centro de RMN do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, em espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em tubos de 5 mm de diâmetro. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando acetona como padrão interno, tanto para as análises de ^{13}C (31,45 ppm) como para ^1H (2,225 ppm).

3.6.1.1 Técnicas de RMN Monodimensionais

3.6.1.1.1 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN de ^{13}C)

Para as análises de RMN de ^{13}C as amostras foram dissolvidas em uma concentração de aproximadamente 40 mg/mL em uma mistura de $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (água deuterada) de 9:1. Os espectros desacoplados de RMN de ^{13}C foram obtidos na frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, fazendo-se, em média, 60.000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos.

3.6.1.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H)

As amostras foram dissolvidas em D_2O (99%, Cambridge Isotopes Laboratories Inc.), em uma concentração de aproximadamente 10 mg/mL. Com a finalidade de diminuir a intensidade do sinal relativo do hidrogênio ligado ao oxigênio das moléculas de água, o qual prejudica a qualidade do espectro obtido, foi feita a troca dos hidrogênios das hidroxilas por deutério e a remoção das moléculas de água presentes. Este processo foi realizado através da dissolução das frações em D_2O , congelamento e liofilização (repetido por, no mínimo, três vezes). Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz.

3.6.1.2 Técnicas de RMN Bidimensionais (RMN 2D)

3.6.1.2.1 HSQC (*Heteronuclear single quantum coherence*)

A técnica RMN 2D HSQC permite determinar quais átomos de hidrogênio (^1H) estão ligados aos respectivos átomos de carbono (^{13}C), a partir de sinais de ^{13}C conhecidos ou de ^1H já determinados pela literatura. Para os experimentos bidimensionais, as amostras são preparadas seguindo o mesmo protocolo de preparo de RMN de ^1H e ^{13}C .

3.6.2 Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas no Departamento de Farmácia da UFPR, em espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier da marca BRUKER, modelo ALPHA. As amostras em estado sólido (2 mg) foram submetidas diretamente ao laser, gerando espectros na faixa de frequência de 3600 a 600 cm^{-1} . As análises dos espectrogramas foram realizadas através do software OPUS viewer.

3.6.3 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

As análises de EDS foram realizadas simultaneamente com as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR (CME-UFPR). O equipamento utilizado foi o TESCAN VEGAS 3 LMU (Tescan, USA), operando com cátodo de tungstênio a 20.0 kV e pressão interna controlada.

Para as análises de EDS, as amostras foram fixadas com solução de Karnovsky, desidratadas gradualmente com etanol e submetidas ao processo de ponto crítico (descrição na seção 3.9.1.1 e 3.9.1.2, pág. 73 e 74, respectivamente). Após secas, as amostras foram analisadas em três pontos distintos.

3.7 MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS

3.7.1 Termogravimetria (TGA)

As análises de TGA foram realizadas em equipamento da marca NETZSCH modelo STA 449 F3 Júpiter, no Departamento de Química da UFPR. As amostras (5-10 mg) foram pesadas em cadinho de alumínio e no forno do equipamento, submetidas a uma temperatura inicial de 20°C, com aumento gradual de 10°C por min, chegando a temperatura final de 700°C, em atmosfera inerte de nitrogênio (100 mL/min).

3.7.2 Capacidade de Absorção de Fluídos

Para verificar a capacidade de absorção de fluídos dos hidrogéis, as amostras foram submergidas em água destilada e tampão fosfato de sódio (20 mM/L e pH 7,0). Foram selecionadas amostras com tamanhos e peso similares, e nos períodos de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 e 48 h, os hidrogéis foram retirados da solução e secos em papel filtro para retirar o excesso de líquido não absorvido. O peso das amostras foi verificado em balança analítica de precisão digital (Denver Instrument APX-200), e comparado com o seu peso inicial. Este experimento foi realizado em triplicata.

3.8 ANÁLISES BIOLÓGICAS

3.8.1 Material Biológico

O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Humanos parecer 1.759.702 (Apêndice A, pág. 197). As amostras de tecido adiposo foram coletadas a partir de 13 doadores saudáveis, mediante prévia autorização através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B, pág. 207). As coletas foram realizadas no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, por médicos cirurgiões plásticos especializados, utilizando técnicas para cirurgia de abdominoplastia. Após a coleta, as amostras foram manipuladas em no máximo 24 h.

3.8.1.1 Isolamento de Células-tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo (CTA)

O isolamento e cultivo das células foram realizados em colaboração com o Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe. O isolamento das CTA a partir de amostras de tecido adiposo foi realizado segundo metodologia adaptada de Zuk et al (2002) e Bunnell et al (2008). As amostras foram maceradas com o auxílio de bisturi até a obtenção de pequenos grumos, e em seguida foram lavadas três vezes com tampão fosfato salino (PBS) (Sigma, St. Louis, MO - USA) contendo 300 unidades/mL de penicilina e 300 µg/mL de estreptomicina (Sigma, St. Louis, MO - USA). Após a lavagem das amostras e remoção dos *debris*, estas foram submetidas

a digestão do tecido através da ação da collagenase tipo I A (Sigma, St. Louis, MO - USA). Para tal, as amostras foram colocadas em 50 mL do tampão PBS (contendo 300 unidades/mL de penicilina e 300 µg/mL de estreptomicina) com 0,075% da enzima, homogeneizadas e incubadas sob agitação branda a 37°C por 30 min. Em seguida, a atividade da collagenase foi inativada adicionando 50 mL do meio Eagle modificado por Dulbecco/F12 (DMEM/F12) (LGC Biotecnologia, Brasil), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO B Life Technologies, inc., Rockville-USA RL). As amostras foram submetidas a centrifugação (600 x g por 10 min). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 10 mL de PBS (contendo 300 unidades/mL de penicilina e 300 µg/mL de estreptomicina). A suspensão de células foi filtrada em malha de 100 µm (Becton Dickinson, USA), seguida da centrifugação (600 x g por 10 min). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 5 mL do meio DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB, 1% de L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando Azul de Trypan (Sigma, St. Louis, MO - USA), como será descrito na seção seguinte 3.8.1.2, e então semeadas na quantidade de 1×10^5 células por cm^2 em frascos de cultivo de 75 cm^2 com meio DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB, 1% de L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (meio de cultivo padrão) e incubadas a 37 °C e 5% de CO_2 .

3.8.1.2 Contagem de Células

Para verificar a concentração de células utilizou-se a câmara de Neubauer, que consiste em 9 quadrantes, sendo estes cobertos por uma lamínula, representando um volume total de $0,1 \text{ mm}^3$. A profundidade central da câmara é de 1 mm. As 4 áreas grandes angulares (L) são subdivididas em 16 áreas com 0,25 mm de cada lado. A grande área central é subdividida em 25 grupos quadrados de 0,2 mm de cada lado. Cada grupo consiste de 16 mini-áreas com 0,05 mm de lado, tendo cada área $0,0025 \text{ mm}^2$. É observado que todas as áreas têm uma borda tripla em cada lado. A linha central é o limite e determina quando uma célula deve ser incluída na contagem ou não. Como 1 cm^3 é equivalente a 1,0 mL, é possível determinar a quantidade de células por mL. O cálculo para a contagem de células foi realizado a partir dos seguintes parâmetros: quantidade de células total contadas

nos quadrantes, o fator de diluição da solução de célula com a solução de Azul de Trypan, a quantidade de quadrantes utilizados na contagem e o volume total em que as células foram diluídas.

Durante os cultivos, a suspensão contendo células foi misturada com a solução de Azul de Trypan (Sigma, St. Louis, MO - USA) na diluição de 1:1 (10 µL da suspensão de células para 10 µL do Azul de Trypan), e em seguida, foi utilizado o volume de 10 µL desta mistura para cada câmara. Na contagem foram considerados os quatro quadrantes angulares (L) de cada câmara.

3.8.1.3 Cultivo das CTA

Após 72 h do isolamento das CTA, o meio de cultivo foi aspirado das garrafas e descartado. Em seguida, foram adicionados 15 mL do meio de cultivo padrão e novamente as células foram mantidas em incubadoras a 37 °C e 5% de CO₂. A troca do meio foi realizada duas vezes na semana, até o momento em que as células alcançassem 80 a 90% de confluência. Após as células atingirem a confluência desejada, foi realizada a dissociação enzimática e expansão dessas células, conforme descrito a seguir.

3.8.1.4 Dissociação Enzimática e Expansão das CTA

A dissociação enzimática das células, também conhecida como tripsinização, tem por objetivo recuperar as células que estavam aderidas à superfície de crescimento do frasco de cultivo. É realizada quando as células estão em um estágio avançado de proliferação, ocupando quase todo o frasco. Torna-se então necessário o replaqueamento destas em novos frascos, e nesta etapa, as células são consideradas em uma nova passagem. Considerando que a primeira semeadura das células foi a passagem 1 (P1), as células foram cultivadas sucessivamente até a passagem 3 (P3) e os ensaios biológicos foram realizados com células na passagem 4 (P4).

A dissociação enzimática foi realizada após as células atingirem 80 a 90% de confluência na placa de cultivo. As células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com 5 mL de uma solução de tripsina/EDTA (0,25%) (Sigma, St. Louis, MO - USA) por 5 min a 37°C e 5% de CO₂. O desprendimento das células foi

verificado em microscópio, e em seguida, para inibir a atividade da enzima tripsina adicionou-se igual volume de meio de cultivo padrão (DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB, 1% de L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). A suspensão de células foi centrifugada a 600 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 5 mL de meio de cultivo padrão. As células foram contadas em câmara de Neubauer (como descrito na seção 3.8.1.2), e semeadas em garrafas de 75 cm² na concentração de 1x10³/cm². As células foram mantidas em cultivo, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente (Seção 3.8.1.3), até alcançar a passagem 4 para os ensaios biológicos.

3.8.1.5 Criopreservação

Após a tripsinização das células em P2, uma fração destas foi submetida ao processo de criopreservação. As células foram contadas em câmara de Neubauer, e alíquotas de 1 mL contendo 1x10⁶ células foram transferidas para tubos criogênicos pré-identificados (tipo celular, densidade, passagem e data). O meio crioprotetor utilizado é composto de 80% de SFB, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (LGC Biotecnologia, Brasil) e 10% de DMEM/F12 com 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Os tubos foram resfriados com o auxílio do equipamento de congelamento programável Nicool Lm10 (Air Liquide, Marne La Vallée, France). O programa de congelamento utilizado foi: 15 min na velocidade 3, 45 min na velocidade 5 e 10 min na velocidade 10. O congelamento vagaroso das células através deste método impede que ocorra a formação de cristais de gelo no interior da célula (DE ROSA et al., 2009). Finalizado o programa, os tubos contendo as células foram transferidos para o nitrogênio líquido a -196°C e mantidos por aproximadamente 60 dias.

3.8.1.6 Descongelamento das CTA

O descongelamento das células foi realizado conforme o desenvolvimento dos experimentos biológicos. Para o descongelamento das CTM primeiramente preparou-se um tubo contendo 9 mL de meio de cultivo padrão. Em seguida, as células foram retiradas do reservatório de nitrogênio líquido e aquecidas em banho-

maria a 37°C. Na iminência do descongelamento, o material foi transferido para o tubo contendo o meio e centrifugados a 600 x g por 10 min. O sobrenadante gerado foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 5 mL do meio de cultivo padrão, sendo plaqueado em garrafas de 75 cm² para o cultivo e expansão das CTM, como descrito anteriormente.

3.8.1.7 Caracterização e Viabilidade das CTA por Análises Imunofenotípicas

As células isoladas do tecido adiposo foram analisadas quanto à expressão de marcadores específicos de superfície (Quadro 1), utilizando anticorpos monoclonais contra antígenos CD (*Cluster of Differentiation*), conjugados com fluorocromos (Becton Dickinson, USA). As análises foram realizadas com células na passagem P4, em citômetro de fluxo FACS Canto II (Becton Dickinson, USA).

Para a análise imunofenotípica as células foram cultivadas até a passagem P4 e dissociadas enzimaticamente, como descrito anteriormente. As células foram diluídas em PBS na concentração de 1×10^6 células/mL, e em seguida foram transferidos 200 µL do pool de células para 4 tubos de citometria. Em cada tubo foram adicionado os anticorpos, conforme o painel representado no Quadro 1. As alíquotas foram incubadas com os anticorpos durante 20 min no escuro, e em seguida, foram adicionados 200 µL de PBS, centrifugadas por 10 min a 600 x g. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* ressuspendido em 200 µL de PBS, seguida da adição do corante 7AAD (Becton Dickinson, USA). As amostras foram novamente incubadas por 20 min no escuro, e após a adição de 200 µL de PBS, foi realizada a análise no citômetro de fluxo.

A análise por citometria de fluxo foi realizada em 20.000 eventos (células), sendo que FL1 representa a leitura para FITC, FL2 leitura para PE e FL3 leitura para 7AAD.

QUADRO 1. PAINEL DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE UTILIZADOS PARA ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DAS CTM DE TECIDO ADIPOSEO

Tubos	Marcadores
1	Controle somente com células
2	Controle isotípico
3	CD90 FITC/CD105 PE/ CD34 APC/7AAD
4	CD49d FITC/CD45 PE/ CD73 APC/7AAD

Os valores de porcentagem de cada marcador foram analisados através do software Cyflogic v.1.2.1. Os resultados foram apresentados pelo software através da sobreposição do controle isotópico com a marcação de expressão de cada marcador. As expressões são negativas quando a marcação sobrepõe a marcação do controle isotópico. Expressões positivas são apresentadas por marcações que estão fora da sobreposição da marcação do controle isotópico. Quanto mais distante do controle isotópico estiver a marcação da expressão, maior a população de células positivas para o marcador em questão. Após a sobreposição, o próprio software apresenta uma tabela de valores em porcentagem de expressão para cada marcador.

3.8.2 Preparo dos Hidrogéis HQ

Para as análises biológicas foram utilizados os hidrogéis de proporções heteroramnana:quitosana 2:1 e 3:2. Os hidrogéis secos foram cortados em dimensões similares de aproximadamente $0,5\text{ cm}^2$. Para a esterilização do material, cada face foi mantida por 2 h sob UV, e em seguida, cada hidrogel foi acomodada em poço de placas de 48 poços. Para a reidratação dos hidrogéis, primeiramente foram lavados duas vezes com tampão PBS (Sigma, St. Louis, MO - USA) contendo 300 unidades/mL de penicilina e 300 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Sigma, St. Louis, MO - USA), e em seguida, foram adicionados 200 μL de meio de cultivo padrão (DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB, 1% de L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina) e mantidos por 48 h em estufa a 37°C e 5% de CO_2 .

Após a reidratação dos hidrogéis, o meio de cultivo excedente foi retirado, as CTA cultivadas até P3 e dissociadas enzimaticamente, como descrito anteriormente. As células foram semeadas sobre os hidrogéis na concentração de $2 \times 10^4/\text{mL}$ por poço, e mantidas em cultivo em estufa a 37°C e 5% de CO_2 , sendo feita a troca do meio de cultivo duas vezes na semana.

3.8.2.1 Análises de Viabilidade

A viabilidade das células nos hidrogéis HQ foi verificada por análises de imunofluorescência. As células foram mantidas em cultivo nos hidrogéis por 24, 48 e 72 h de cultivo, e em seguida, foram submetidas a uma lavagem com PBS (Sigma, St. Louis, MO - USA) e fixadas com solução de paraformaldeído 4% (Electron Microscopy Sciences, Washington, NY, USA) por 30 min. As amostras foram lavadas duas vezes com PBS, e em seguida, foram adicionados a solução de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) (Molecular Probes, Eugene, EUA) e iodeto de propídio (BD, Becton Dicksons, USA) (5 µg/mL em PBS) na ausência de luz e analisadas por Microscopia de Fluorescência Confocal.

3.8.2.2 Caracterização da Matriz Extracelular

Para a caracterização da matriz extracelular por imunofluorescência, as células foram mantidas em cultivo nos hidrogéis HQ por 21 dias, e em seguida, foram submetidas a uma lavagem com PBS (Sigma, St. Louis, MO - USA) e fixadas com solução de paraformaldeído 4% (Electron Microscopy Sciences, Washington, NY, USA) por 30 min. As amostras foram lavadas duas vezes com PBS, e em seguida, para o bloqueio dos radicais aldeídicos livres, foram incubadas com solução de glicina (0,1% em PBS) por 2 min (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os hidrogéis foram novamente lavados com solução de PBS contendo 1% de albumina e 0,01% de saponina (Sigma Aldrich) por 3 h, para o bloqueio dos sítios de interação inespecíficos de proteínas.

Para a marcação da matriz extracelular foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-fibronectina, e seus respectivos conjugados, conforme apresentado no Quadro 2. O anticorpo anti-fibronectina foi produzido e gentilmente doado pelo Prof. Silvio Marques Zanata do Departamento de Patologia da UFPR, foi diluído em PBS contendo 1% de BSA e mantidos *overnight*. Após o período de incubação, as células foram lavadas com a solução de PBS contendo 1% de albumina e 0,01% de saponina, seguida de mais duas lavagens com PBS. Os hidrogéis foram submetidos a um novo bloqueio com PBS contendo 1% de BSA e 0,01% de saponina por 1 h, para posterior incubação com o respectivo conjugado primário.

Os hidrogéis marcados com anti-fibronectina foram incubados com anti-IgY

de galinha (Sigma Aldrich, USA), seguido de um novo ciclo de lavagens e bloqueios, como descrito acima, e para a ligação do conjugado secundário foi utilizado o Anti-IgG de coelho conjugado com Texas Red (Jackson Immuno Research, USA). Ao final das reações de imunomarcação, os hidrogéis foram lavados três vezes com PBS e montados em lâminas histológicas com Fluoromont G com DAPI (Electron Microscopy Science, USA) e analisados por Microscopia de Fluorescência Confocal.

QUADRO 2. PAINEL DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE UTILIZADOS PARA ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DA MATRIZ EXTRACELULAR PRODUZIDA PELAS CTM DE TECIDO ADIPOSEO

Anticorpo-primário	Conjugado primário	Conjugado secundário
Anti-fibronectina	Anti-IgY de galinha	Anti-IgG de coelho, conjugado com Texas Red

3.9 ANÁLISES MICROSCÓPICAS

3.9.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de MEV foram realizadas através do equipamento TESCAN VEGAS 3 LMU (Tescan, USA), operando com cátodo de tungstênio a 20.0 kV e pressão interna controlada, no CME-UFPR. As amostras foram analisadas nas seguintes dimensões: o interior dos hidrogéis foi analisado em magnitude de 750x, 2000x e 5000x. As análises de superfície dos hidrogéis foram realizadas em magnitude de 100x, 500x, 5000x e 13000x. E as análises das células-tronco mesenquimais sobre os hidrogéis foram realizados em magnitude de 3000x, 5000x e 10000x.

Análises morfométricas da espessura das lamelas, espaçamento entre elas, tamanho dos poros e das células, foram realizadas com auxílio do software Fiji (Image J). Como base estatística foram realizadas 10 medições de cada parâmetro.

3.9.1.1 Fixação e Desidratação das Amostras

Os hidrogéis HQ foram submetidos a um pré-tratamento de fixação, conforme método descrito por Karnovsky (1965) com adaptações. As amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4, e em seguida, foram

fixadas com a solução de Karnovsky pH 7,4 (solução de cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4, solução de glutaraldeído 2,5%, solução de paraformaldeído 4% e solução de Cloreto de cálcio 1 mM) por 1 h. Após a fixação, as amostras foram lavadas 3x com o tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4. Em seguida, os hidrogéis que foram preparados para análise da estrutura interna foram submetidos a quebra com nitrogênio líquido, como será descrito posteriormente, e os hidrogéis que foram preparados para análise da superfície foram desidratados gradualmente com etanol PA (Merck). A desidratação das amostras foi realizada com concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) durante 10 min em cada concentração. Na concentração final de 100%, o processo foi repetido duas vezes. Após as etapas de fixação e desidratação, as amostras foram submetidas ao ponto crítico.

Os hidrogéis preparados com o intuito de analisar a estrutura interna formada foram submetidas a quebra com nitrogênio líquido. Após o processo de fixação, os hidrogéis foram congelados adicionando vagarosamente nitrogênio líquido, e em seguida, foram fracionadas por força mecânica. Os fragmentos gerados foram submetidos ao processo de desidratação gradual com álcool, como descrito anteriormente, e secos em estufa a 40°C durante 4 h.

3.9.1.2 Ponto crítico e Metalização

As amostras desidratadas com etanol absoluto foram submetidas ao processo de secagem via ponto crítico de CO₂, através do equipamento Bal-Tec CPD - 030. Em seguida, as amostras foram fixadas sobre os suportes metálicos, com o auxílio de fitas adesivas dupla-face de cobre e esmalte contendo carbono coloidal, e metalizadas em ouro com o auxílio do equipamento Balzers SCD – 030.

3.9.2 Microscopia Confocal de Fluorescência por Varredura Laser

As análises de Microscopia Confocal de Fluorescência por Varredura Laser foram realizadas no Centro de Microscopia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, através do equipamento de modelo Radiance 2100 (Bio Rad Hercules, Richmond, CA, USA). A preparação e marcação das amostras que foram analisadas por Microscopia Confocal foi descrita nos itens 3.8.2.1 e 3.8.2.2. As amostras foram analisadas em aumento de 20x, 40x e 60x. As fotos geradas foram processadas

com o auxílio do software Fiji (Image J).

3.9.3 Raman

As análises de Raman foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, através do microscópio Raman confocal da marca Witec, modelo Alpha 300R. As amostras (2 mg) foram submetidas diretamente em contato com o laser verde (532 nm), com um tempo de integração de 3 a 10 s de acumulações, gerando espectros na faixa de frequência de 2800 a 600 cm^{-1} . As análises dos espectrogramas foram realizadas através do software OPUS viewer.

3.9.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Para a análise da rugosidade e topografia de heteroramnana, quitosana e dos hidrogéis de proporções HQ 2:1 e 3:2, utilizou-se um microscópio de força atômica TT-AFM (AFM Workshop, USA), pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí (BIOTEC/UFPI). Áreas representativas de 2,5 x 2,5 μm foram escaneadas e analisadas pelo programa Gwyddion 2.4. A topografia foi analisada utilizando as imagens em 3D obtidas no AFM e o parâmetro de rugosidade analisado foi a rugosidade média aritmética (R_a), a partir de múltiplas áreas analisadas de 0,5 x 0,5 μm ($n=15$).

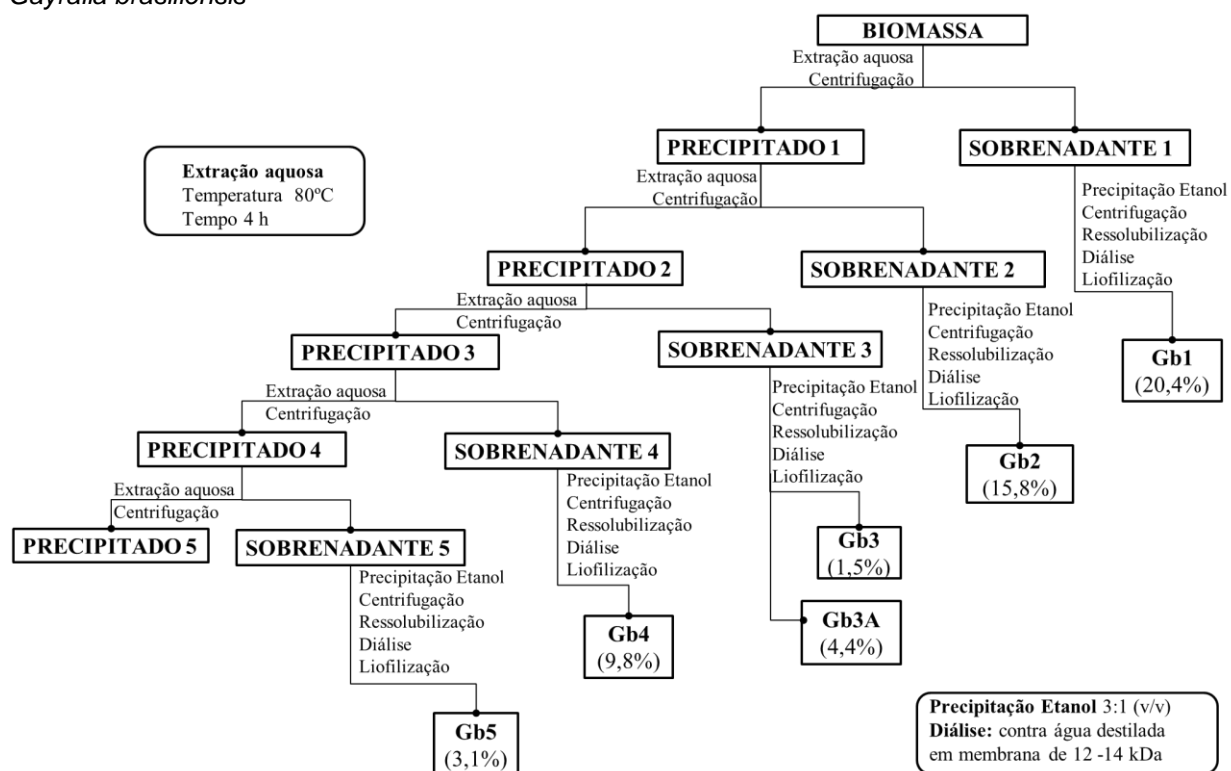
A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism® 6.0. Os resultados de rugosidade foram expressos como médias \pm EPM. Para comparação entre os valores médios obtidos utilizou-se o teste estatístico ANOVA de uma via. Foi estabelecido um $p<0,05$ para a diferença entre as médias ser considerada estatisticamente significativa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS

A quitosana foi obtida comercialmente, enquanto que para a obtenção dos polissacarídeos de *G. brasiliensis* foi realizado o processo por extração aquosa, conforme descrito no fluxograma a seguir (Figura 5).

FIGURA 5. FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA MACROALGA VERDE *Gayralia brasiliensis*



4.1.1 Extração e Obtenção dos Polissacarídeos de *G. brasiliensis*

A alga seca e moída foi submetida a cinco extrações aquosas sequenciais a 80°C por 4 h. Os cinco extratos obtidos de *G. brasiliensis* foram dialisados e liofilizados, gerando frações com rendimento variando entre 3 a 20% em relação ao peso inicial da alga seca. O rendimento de cada extrato está descrito na Figura 5 e na Tabela 2.

Em estudos realizados por Medcalf e colaboradores (1975), demonstrou-se que a composição química de uma mesma espécie de alga pode variar

consideravelmente de acordo com a época de colheita e o método de extração aplicado. Para a alga verde *Ulva lactuca*, verificou-se que no período de verão no hemisfério norte (entre Junho e Julho) o rendimento das frações polissacarídicas foi maior em comparação a outras épocas do ano, utilizando o mesmo método de extração.

O processo de extração de polissacarídeos pode ser realizado por diferentes metodologias (ALVES et al., 2013). Para as algas verdes, a extração aquosa à quente tem-se demonstrado mais eficiente, em comparação com outros processos de extração (MCKINNELL et al., 1961; SIDDHANTA et al., 2001; CASSOLATO et al., 2008). Yamamoto (1980) realizou a extração aquosa de macroalgas testando diferentes temperaturas, com três espécies diferentes de alga verde, e verificou que em baixas temperaturas (entre 30-40°C), polissacarídeos de alto peso molecular não são extraídos, enquanto que em altas temperaturas (entre 80-90°C), tanto as moléculas de alto, como as de baixo peso molecular são extraídas.

O rendimento total das extrações de *G. brasiliensis* foi de 54,9%, sendo o extrato Gb1 o que apresentou o maior rendimento (20,4%). Estes resultados são semelhantes aos previamente obtidos por Berté (2013), que obteve um rendimento total de 49,6%.

4.1.1.1 Análise Química dos Extratos Polissacarídicos

Após a obtenção dos polissacarídeos, foram realizadas análises químicas dos extratos para dosar a concentração de açúcar total (DUBOIS et al., 1956), sulfato (DODGSON; PRICE, 1962), ácido urônico (FILISSETTI-COZZI; CARPITA, 1991) e proteínas (LOWRY et al., 1959). Verifica-se que os extratos são compostos majoritariamente de carboidratos com teores variando entre 46 a 65%, seguido de um alto teor de grupos O-sulfato (22 a 29%), ácidos urônicos (13 a 17%) e baixo teores de proteínas (4 a 9%). Estes resultados podem ser observados na Tabela 2.

Os valores obtidos no presente trabalho estão de acordo com estudos prévios para a mesma espécie (BERTE, 2013), e também com aqueles obtidos para a espécie *G. oxysperma* (CASSOLATO et al., 2008; ROPELLATO et al., 2015). Apesar de serem espécies diferentes, são pertencentes ao mesmo gênero *Gayralia* e apresentam similaridade em diversas características morfológicas e genéticas (PELIZZARI et al., 2013). Em outras espécies de algas verdes pertencentes ao

gênero *Ulva*, também foram verificadas concentrações similares de carboidratos e proteínas em sua composição, entretanto, apresentaram maiores concentrações de ácidos urônicos (24 a 30%) e menores concentrações de sulfato (10 a 17%) (SIDDHANTA et al., 2001).

TABELA 2. RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES BRUTAS DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *G. brasiliensis*.

Frações	Rendimento ^a (%)	Açúcar Total (%)	Sulfato (%)	Ác. Urônico (%)	Proteína (%)
Gb1	20,4	64,4	26,8	16,6	4,1
Gb2	15,8	62,4	26,8	13,9	8,8
Gb3	1,5	51,7	25,5	16,1	6,5
Gb3A	4,4	46,3	23,7	14,4	7,7
Gb4	9,8	46,5	22,2	13,7	6,4
Gb5	3,1	49,8	28,9	13,6	5,1

^a Os rendimentos foram calculados em relação a massa inicial de alga seca moída extraída.

As algas verdes pertencentes ao gênero *Ulva* apresentam em sua composição concentrações de proteínas que podem variar de 10 a 26% do peso seco da planta (FLEURENC et al., 1999). Os extratos obtidos no presente trabalho apresentaram relativamente baixas concentrações de proteína, principalmente o extrato utilizado para a obtenção dos hidrogéis (Gb1, 4,1% de proteína), não sendo necessários tratamentos posteriores de purificação. Nos estudos comparativos entre o método de extração aquosa à frio e extração aquosa à quente, observa-se uma diminuição significativa da concentração de proteínas, supostamente em decorrência da desnaturação por altas temperaturas. As concentrações de carboidratos, ácido urônico e sulfato permaneceram similares, demonstrando ser um método não destrutivo para polissacarídeos (SIDDHANTA et al., 2001).

4.1.1.2 Composição Monossacarídica dos Extratos Polissacarídicos

A análise de composição monossacarídica (Tabela 3) demonstrou que a ramnose é o principal monossacarídeo neutro (55 a 77%) presente nos extratos, seguido da glucose (11 a 24%), xilose (8 a 11%), galactose (2 a 6%) e em menores quantidades manose (2 a 3%) e arabinose (0,5 a 2%). Esses resultados são

similares ao obtidos por Berté (2013), onde foi demonstrada uma composição monossacarídica majoritária de ramnose, glucose e xilose.

TABELA 3. MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NOS EXTRATOS AQUOSOS ISOLADOS DE *G. brasiliensis*.

Frações	Rha	Xyl	Glc	Gal	Ara	Man
Gb 1	56,1	9,5	24,0	6,5	0,5	3,4
Gb 2	60,0	9,3	23,1	4,6	---	3,0
Gb 3	70,5	8,5	14,0	3,1	1,9	2,0
Gb 3A	76,8	8,8	14,4	---	---	---
GBb 4	74,5	10,3	11,5	2,3	1,4	---
Gb 5	73,3	11,1	12,1	2,3	1,2	---

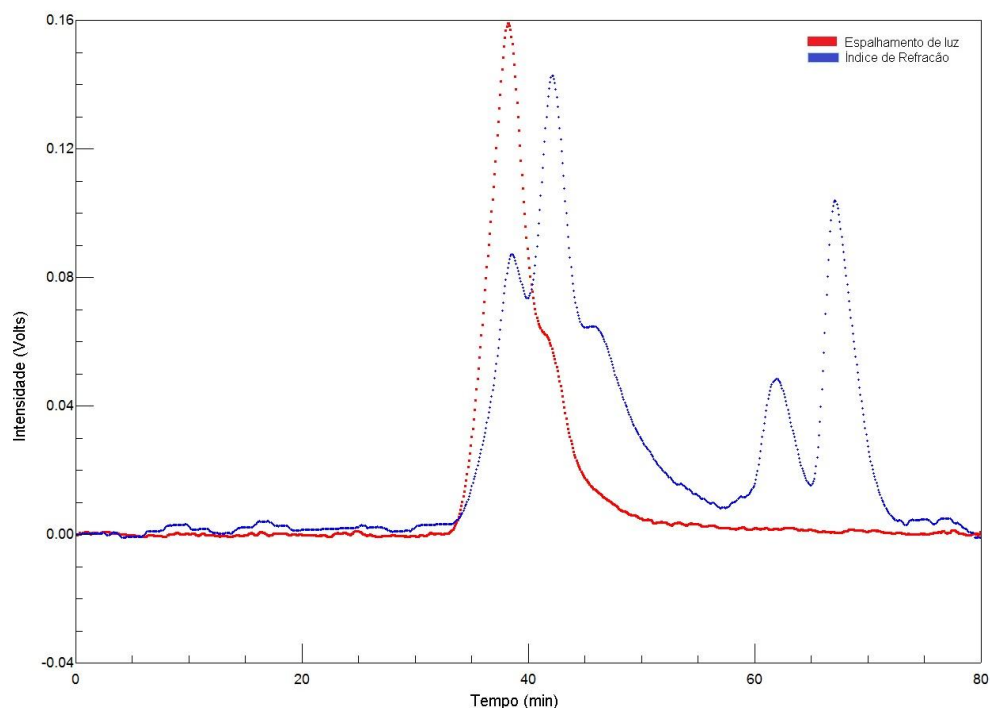
--- Não detectado. ^a Monossacarídeos quantificados por GC-MS na forma de acetatos de alditóis.

Na ordem Ulvales observa-se que diversas espécies de algas verdes, entre elas *Gayralia oxysperma*, apresentam uma composição monossacarídica similar, contendo ramnose, glucose e xilose como principais monossacarídeos neutros (BRADING et al. 1954; MCKINNELL et al., 1961; SIDDHANTA et al., 2001; CASSOLATO et al., 2008; ROPELLATO et al., 2014). Os resultados obtidos de composição monossacarídica, aliados aos de dosagem de sulfato e ácido urônico, indicam que os extratos de *G. brasiliensis* são constituídos de heteroramnanas sulfatadas.

4.1.1.3 Análise por HPSEC-MALLS-IR dos Extratos Polissacarídicos

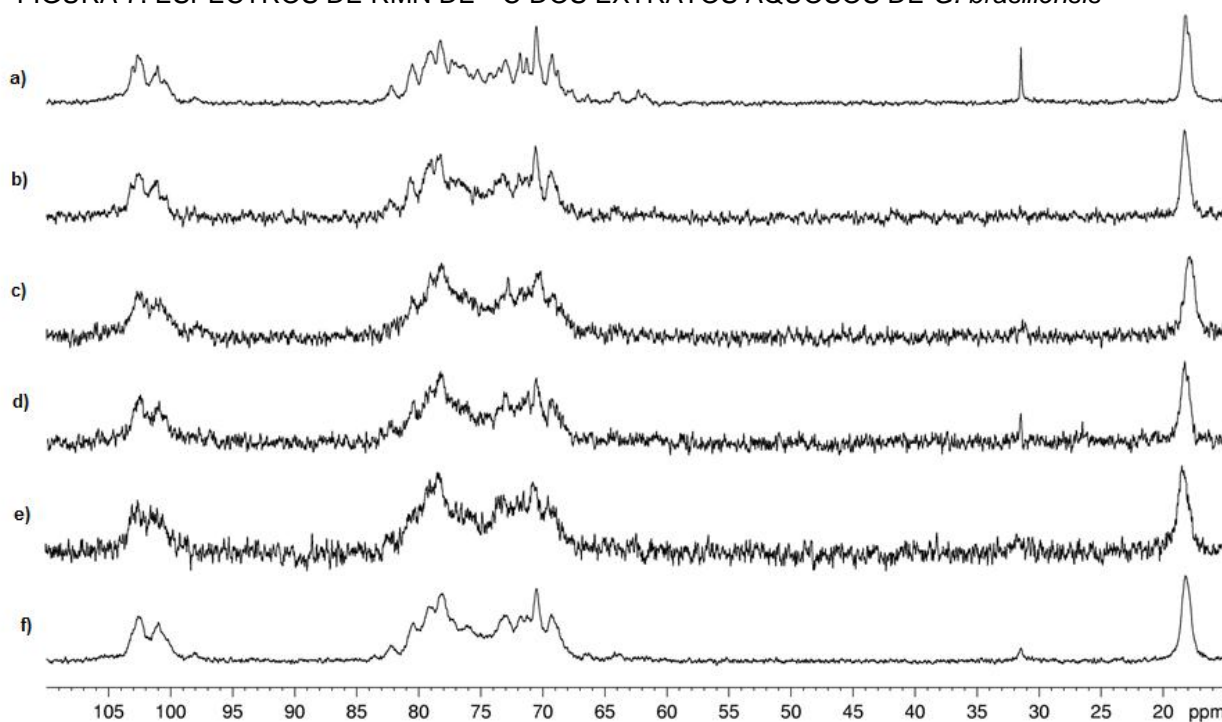
As análises por Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Resolução (HPSEC) acoplada a detectores de espalhamento de luz laser (MALLS) e índice de refração (RID), dos extratos aquosos apresentou perfis polidispersos, indicando a presença de polímeros com diferentes massas moleculares (Figura 6). O pico eluído próximo a 70 min indica a presença de sais. Para a eliminação completa dos sais seria necessário uma diálise mais exaustiva realizada contra água ultrapura (deionizada).

FIGURA 6. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-RID DO EXTRATO Gb1



4.1.1.4 RMN de ^{13}C dos Extratos Polissacarídicos

Os espectros de RMN de ^{13}C dos extratos polissacarídicos de *G. brasiliensis* estão apresentados na Figura 7. Os espectros são similares entre si, apresentando complexa região anomérica (103 e 98 ppm) com vários sinais, alargamento e sobreposições dos mesmos, sugerindo diferentes padrões de substituição da molécula. A presença do sinal alargado de alta intensidade entre 18,2 e 17,9 ppm, correspondente ao C-6 das unidades de ramnose, confirmam os dados obtidos nas análises de composição monossacarídica (Tabela 3, pág. 79), onde a ramnose representa o principal monossacarídeo neutro dos extratos polissacarídicos.

FIGURA 7. ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *G. brasiliensis*

Imagens: (a) Gb1, (b) Gb2, (c) Gb3, (d) Gb3A, (e) Gb4 e (f) Gb5. Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Padrão Interno: Acetona (31,45 ppm).

4.1.2 Caracterização Química dos Polissacarídeos

O extrato Gb1 foi o que apresentou o maior rendimento no processo de extração aquosa (Tabela 2, pág. 78), sendo esta selecionada para o desenvolvimento dos hidrogéis e posterior análises físico-químicas e biológicas. Os polissacarídeos heteroramnana e quitosana foram caracterizados quimicamente por análises de RMN, FTIR e RAMAN, como será descrito a seguir.

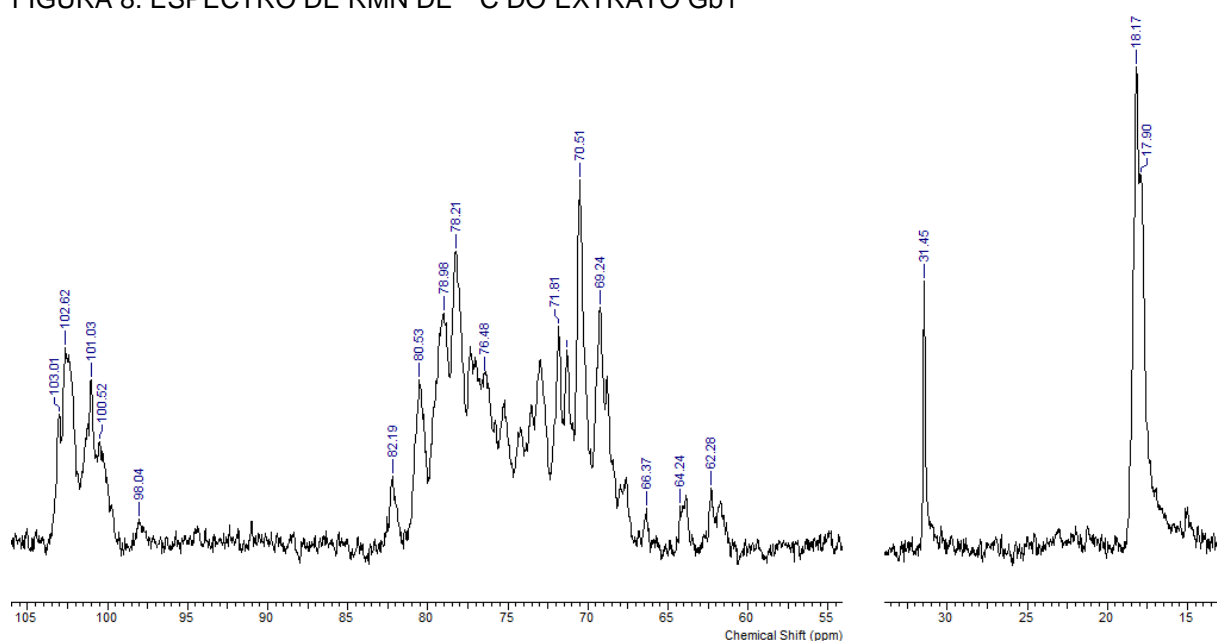
4.1.2.1 Caracterização por RMN

4.1.2.1.1 Análise do Extrato Gb1

O espectro de RMN de ^{13}C do extrato Gb1 (Figura 8) apresentou vários sinais na região dos carbonos do anel (85 e 65 ppm, C-2 até C-5 de hexoses e desoxihexoses), com alargamento e sobreposições dos mesmos, sugerindo diferentes padrões de substituição da molécula. Os sinais em 71,8, 78,2, 78,9-79,1, 80,4-80,6 e 70,5-70,6 ppm, foram atribuídos ao C-2 não substituído, C-2 sulfatado, C-3 não substituído, C-4 sulfatado e C-5 não substituído de unidades de ramnose 3-

ligadas, respectivamente. Os sinais em 82,2-82,3 e 78,2 ppm foram atribuídos ao C-4 sulfatado de unidades de ramnose 2-ligadas, e ao C-2 de unidades de ramnose 3-ligadas 2-sulfatado, respectivamente. Além disto, os sinais em 76,5 e 69,2-69,3 ppm foram atribuídos ao C-3 e C-5 de unidades de ramnose 3-ligada 4-sulfatada, respectivamente. Estes assinalamentos estão de acordo com os previamente obtidos para as heteroramnanas sulfatadas da alga verde *Gayralia oxysperma* (CASSOLATO et al., 2008; ROPELLATO et al., 2014) e podem ser vistos com mais detalhe na Tabela 4.

FIGURA 8. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO EXTRATO Gb1



Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Padrão Interno: Acetona (31,45 ppm).

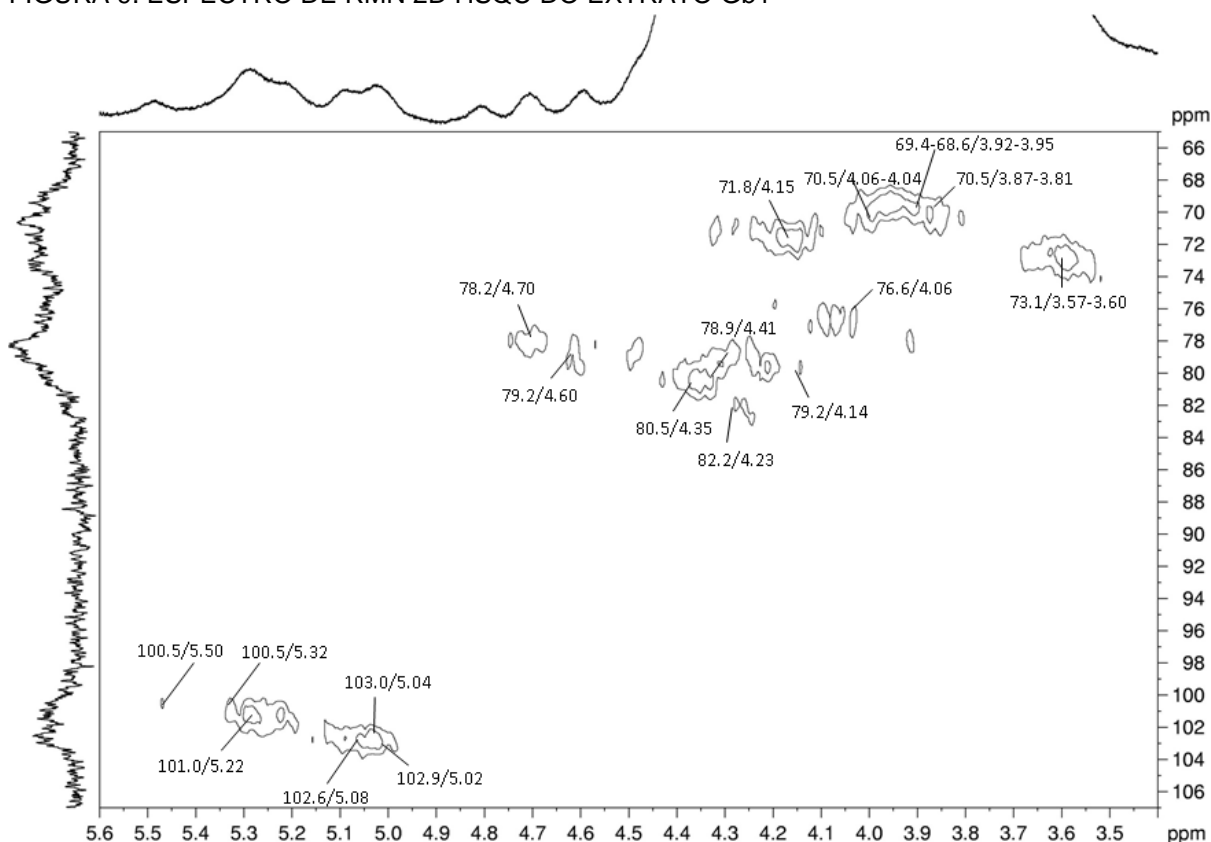
Na análise de RMN 2D HSQC (Figura 9), foi possível verificar as correlações entre os átomos de C e H (C/H) de cada unidade monossacarídica. Os assinalamentos obtidos foram comparados com os descritos por Cassolato et al. (2008) e Ropelato et al. (2014) de alga verde *G. oxysperma*. As correlações anoméricas (C-1/H-1) em 100,5/5,50 e 100,5/5,32 ppm são correspondentes a unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2 e em C-2 e C-4, respectivamente. O sinal na região de 78,2 ppm correlaciona-se com o seu hidrogênio em 4,70 ppm e é correspondente ao C-2 sulfatado dessas unidades (correlação C-2/H-2 em 78,2/4,70 ppm).

A correlação anomérica em 101,0/5,22 ppm foi atribuída a unidades de ramnose 2-ligadas e sulfatadas em C-4 e em C-3 e C-4. Esses sinais poderiam

corresponder também as unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas sulfatadas ou não em C-4. A correlação em 80,5/4,35 ppm foi atribuída ao C-4 sulfatado das unidades de ramnose 3-ligadas 4- e 2,4-sulfatadas. Os sinais de C-5/H-5 encontram-se em 69,4-68,6/3,92-3,95 ppm para as unidades 2-ligadas 4- e 3,4-sulfatadas e 3-ligadas 4- e 2,4-sulfatadas.

O sinal anomérico em 103,0 ppm correlaciona-se com seu próton germinal em 5,04 ppm, sendo esta correlação atribuída a unidades de ramnose 3-ligadas e 3-ligadas 4-sulfatadas. Os acoplamentos dos sinais do C-2 em 71,8 ppm com H-2 em 4,15 ppm são referentes ao C-2 livre dessas unidades. As unidades de ramnose 3-ligadas 4- e 2,4 sulfatadas apresentaram correlações para C-4/H-4 em 80,5/4,35 ppm e para C-5/H-5 em 69,4-68,6/3,92-3,95 ppm.

FIGURA 9. ESPECTRO DE RMN 2D HSQC DO EXTRATO Gb1

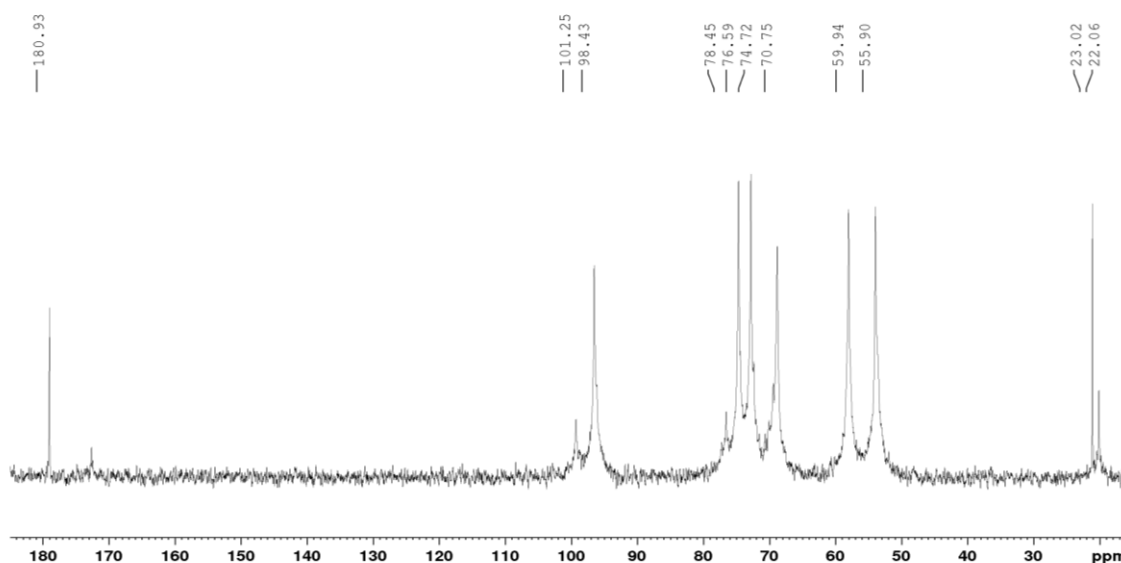


Solvente: D₂O. Temperatura: 70°C. Padrão interno: Acetona (31,45/2,225 ppm).

4.1.2.1.2 Análise da Quitosana

O espectro de RMN de ^{13}C da quitosana utilizada no presente trabalho esta apresentado na Figura 10. O espectro apresentou sinais característicos da molécula e os assinalamentos estão de acordo com os previamente descritos na literatura (DOMARD et al., 1987; CAPITANIA et al., 2001; KASAAI, 2010) e podem ser vistos com mais detalhe na Tabela 4. A partir do espectro é possível observar sinais referentes as unidades de glucosamina (GlcN) e N-acetil glucosamina (GlcNAc). Na região anomérica os sinais 101,3 e 98,4 foram atribuídos ao C-1 das unidades de GlcNAc e GlcN, respectivamente. Os sinais 55,9, 70,8, 76,6, 74,7 e 59,9 ppm foram atribuídos ao C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6 das unidades de GlcN, respectivamente. Por apresentar ângulos de rotação nuclear similares, os sinais dos carbonos do anel das unidades de N-acetil glucosamina se encontram em regiões bem próximas aos das unidades de glucosamina, gerando sinais sobrepostos (apenas os sinais em 101,3 e 78,5 ppm correspondentes a C-1 e C-4, respectivamente, podem ser detectados). O sinal em 174,5 ppm foi atribuído a carbonila e as ligações N-C=O, e o sinal em 22,1 ppm a metila dos grupamentos N-acetil. Os sinais mais intensos em 180,9 e 23,0 ppm correspondem ao ácido acético adicionado para solubilizar a quitosana.

FIGURA 10. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA QUITOSANA



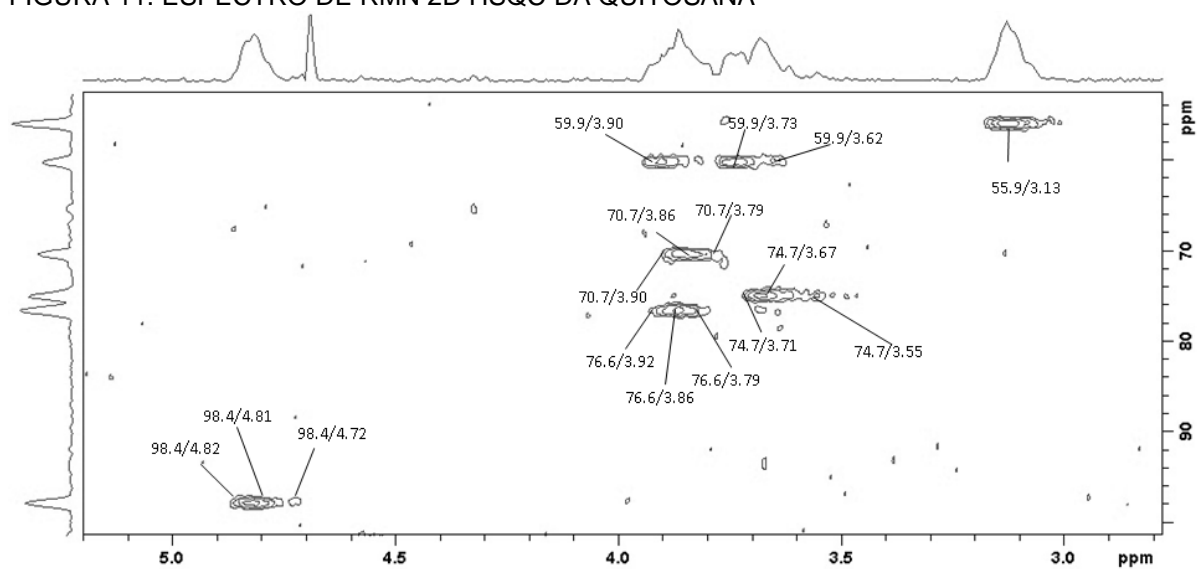
Solvente: $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 9:1 com ácido acético 1%. Temperatura: 30°C. Padrão interno: Ácido acético (23,0 ppm).

As análises de RMN com a quitosana foram realizadas utilizando solução aquosa de ácido acético (1%) como solvente, neste aspecto, não se descarta a possibilidade de ocorrer o processo de acetilação entre o ácido acético e os grupos NH_2 da glucosamina. A formação de grupos N-Acetil no processo de acetilação pode provocar deslocamentos químicos dos átomos de carbono, gerando variações nos espectros de RMN de ^{13}C da quitosana (KASAAI, 2010).

A partir da análise de RMN 2D HSQC da quitosana (Figura 11), foi possível verificar as correlações de seus átomos de C e H. Os assinalamentos obtidos estão de acordo com os previamente descritos na literatura (DOMARD, 1987; CAPITANIA et al., 2001; KASAAI, 2010). As correlações anoméricas em 98,4/4,82-4,72 e 101,3/4,58 ppm são correspondentes ao C-1 das unidades de GlcN e GlcNAc, respectivamente. O sinal em 55,9 ppm correlaciona-se com o seu hidrogênio em 3,13 ppm e é correspondente ao C-2 das unidades de GlcN. As correlações em 70,7/3,90-3,79 ppm foram atribuídas ao C-3/H-3 das unidades de GlcNAc. No espectro de hidrogênio esta região (3,90-3,79 ppm) apresenta sinais bem densos, e poderiam corresponder também ao C-4 destas unidades. Os sinais em 74,7/3,71-3,55 ppm foram atribuídas ao C-5 das unidades de GlcNAc, e os sinais de C-6/H-6 das duas unidades podem ser correlacionados as duas regiões entre 3,90 a 3,62 ppm, relacionados aos dois prótons inequivalentes. Os sinais referente as unidades de glucosamina apresentaram-se fracos ou sobrepostos aos da glucosamida, sendo possível correlacionar 78,4/3,64 ppm ao C-3/H-3, C-4/H-4 e C-5/H-5.

As unidades de GlcNAc também apresentaram sinal característico em 1,90 ppm (resultados não demonstrado), referentes aos hidrogênios do grupo amino acetilado NH-COCH_3 . Nesta região, observa-se a presença de dois sinais intensos, sendo 2,04 ppm atribuído aos três hidrogênios metílicos do ácido acético (CH_3COOH), e o sinal em 1,90 ppm aos três hidrogênios metílicos do N-acetil glucosamina ($-\text{NH-COCH}_3$).

FIGURA 11. ESPECTRO DE RMN 2D HSQC DA QUITOSANA



Solvente: D_2O com Ácido acético 1%. Temperatura: 30°C. Padrão interno: Ácido acético (23,0/1,90 ppm).

TABELA 4. DESLOCAMENTOS QUÍMICO DAS UNIDADES DE RAMNOSE DA HETERORAMNANA (Gb1) E DA QUITOSANA

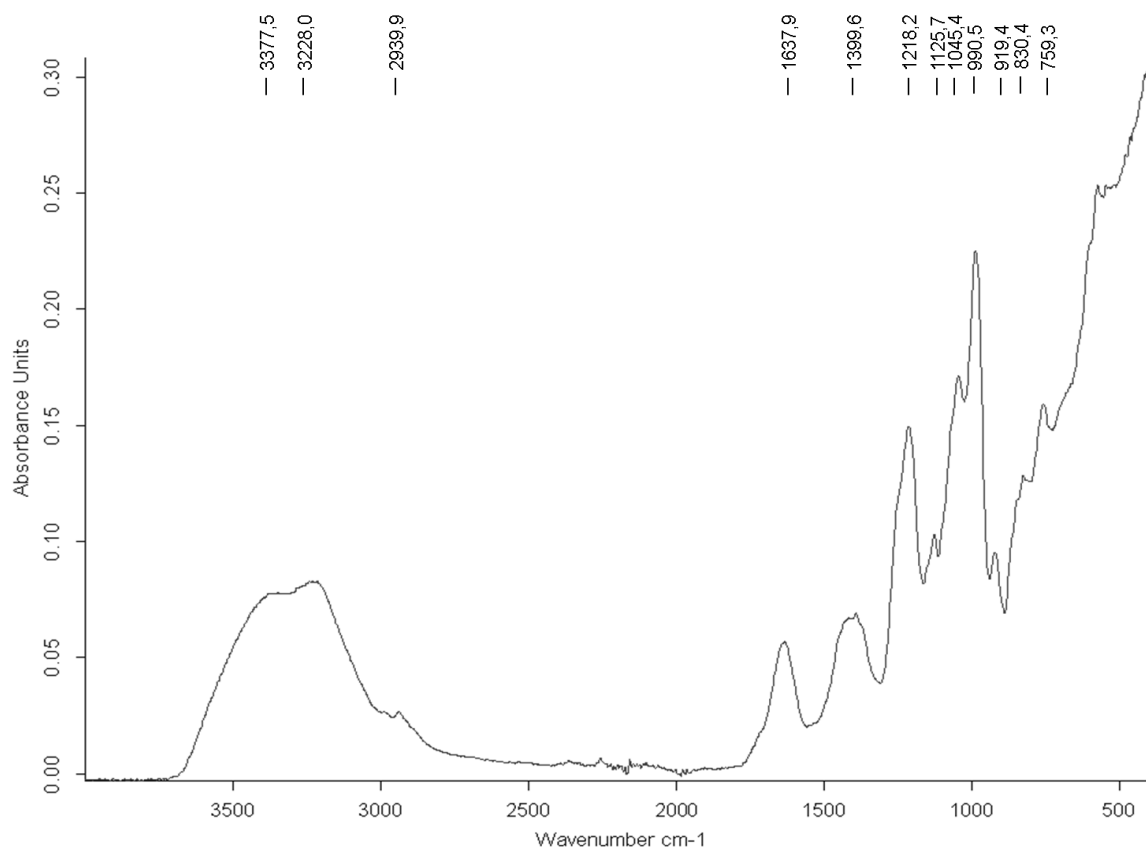
Resíduos de Ramnose	Deslocamento químico (ppm)								Deslocamento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
[→2)- α -L-Rhap-4S-(1→]	101,0	78,9	70,5	82,2	69,2	17,9-18,2	-	-	5,22	4,41	3,81-4,06	4,23	3,92-3,95	1,31-1,45
[→2)- α -L-Rhap-3,4S-(1→]	101,0	77,0	78,2	-	69,2	17,9-18,2	-	-	5,22	4,60	4,70	-	3,92-3,95	1,31-1,45
[→3)- α -L-Rhap-(1→]	103,0	71,8	78,9	71,8	70,4	17,9-18,2	-	-	5,04	4,15	4,41	4,15	3,81-4,06	1,31-1,45
[→3)- α -L-Rhap-2S-(1→]	100,5	78,2	75,7-77,3	73,1	70,5	17,9-18,2	-	-	5,32	4,70	4,06	3,81-4,06	3,81-4,06	1,31-1,45
[→3)- α -L-Rhap-4S-(1→]	103,0 102,6	71,8	75,7-77,3	80,5	69,2	17,9-18,2	-	-	5,04 5,08	4,15	4,06	4,35	3,92-3,95	1,31-1,45
[→3)- α -L-Rhap-2,4S-(1→]	100,5	78,2	75,7-77,3	80,5	69,2	17,9-18,2	-	-	5,32	4,70	4,06	4,35	3,92-3,95	1,31-1,45
[→2,3)- α -L-Rhap-(1→]	101,0	78,2	-	71,8	70,5	17,9-18,2	-	-	5,22	4,70	-	4,15	3,81-4,06	1,31-1,45
Resíduos de GlcN														
[→4)- β -D-GlcN-(1→]	98,4	55,9	70,8	76,6	74,7	59,9	-	-	4,82 4,72	3,13	3,64	3,64	3,64	3,90-3,62
Resíduos de GlcNAc														
[→4)- β -D-GlcNAc-(1→]	101,3	55,9	70,8	78,5	74,7	59,9	174,5	22,1	4,58	3,13	3,90-3,79	3,92-3,79	3,71-3,55	3,90-3,62

4.1.2.2 Caracterização por FTIR

4.1.2.2.1 Análise do Extrato Gb1

O espectro de infravermelho da heteroramnana proveniente do extrato Gb1 (Figura 12) apresentou vibrações da molécula na região entre 3600 a 600 cm^{-1} . Os assinalamentos das bandas foram realizados com o auxílio de estudos envolvendo polissacarídeos de algas verdes pertencentes ao gênero *Ulva* (RAY; LAHAYE, 1995; PENGZHAN et al., 2003; ROBIC et al., 2009a) e podem ser vistos com mais detalhe na Tabela 5.

FIGURA 12. ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA HETERORAMNANA DO EXTRATO Gb1



No espectro é possível observar uma forte e ampla banda na região entre 3500 a 3000 cm^{-1} , sendo relacionado as vibrações dos grupos funcionais $-\text{OH}$ e $-\text{COO}$ livres que estão envolvidos em ligações de hidrogênio inter ou intramolecular. Também observou-se a absorção de bandas características em 1045,4 cm^{-1} , correspondendo a vibrações de $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ das ligações glicosídicas. Os

polissacarídeos apresentam uma composição majoritária de carbono, hidrogênio e oxigênio, neste aspecto, é de se esperar que vibrações relacionadas a ligações acopladas a C–O, C–OH e C–C se apresentem intensamente, sendo a banda 990,5 cm^{-1} atribuída a vibrações de C–O da cadeia principal da heteroramnana.

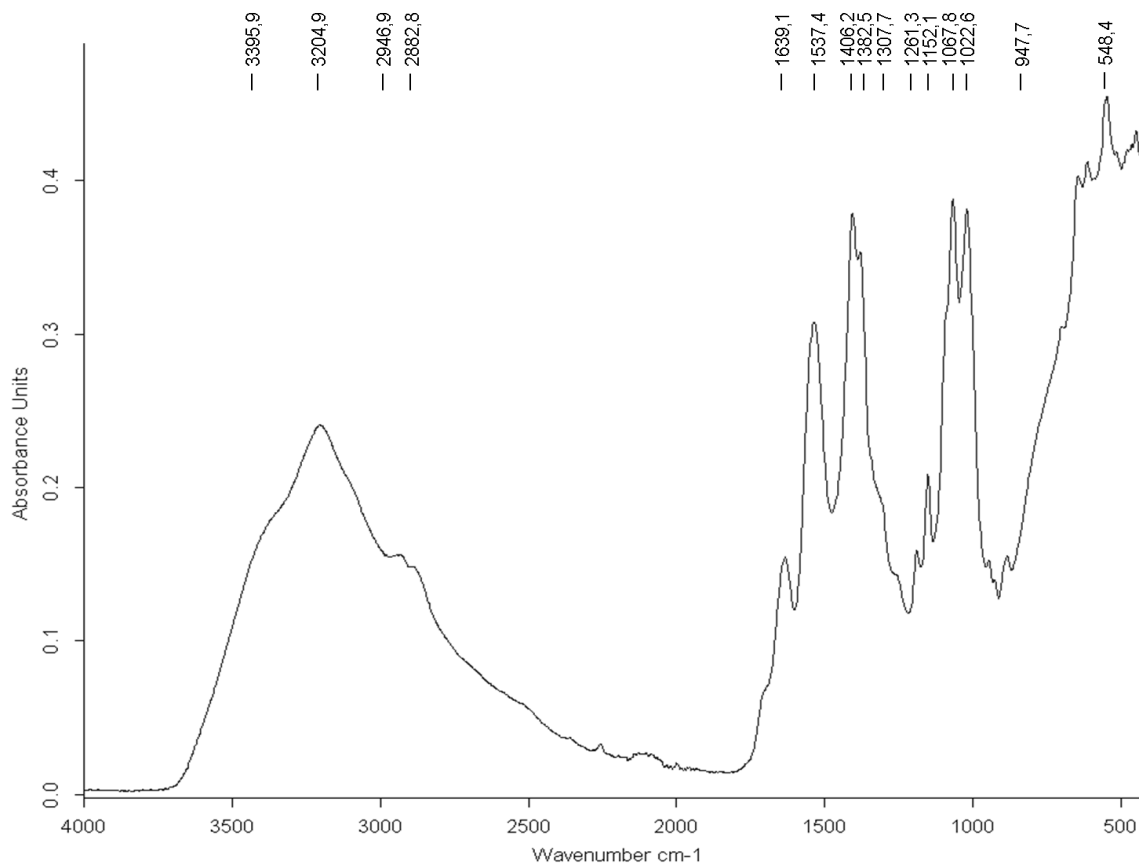
Na região próxima a 1000 cm^{-1} é possível observar a presença de diversas bandas com sinais intensos e sobrepostos. As bandas em 1218,2/830,4/759,3 cm^{-1} são indicativos da presença de substituição de sulfato ester, sendo a banda 1218,2 cm^{-1} atribuída a vibração de C–O–S (RAY e LAHAYE, 1995; ROBIC et al., 2009a). Estes resultados podem ser confirmados com os dados obtidos na dosagem de sulfato (Tabela 2, pág. 78) e nas análises de RMN (Tabela 4, pág. 87), demonstrando a presença dos grupamentos sulfato e a posição em que estão ligados à molécula, respectivamente.

No espectro também é possível observar a presença da banda em 1637,9 cm^{-1} , sendo relacionado a vibrações da carbonila (C=O) dos ácidos urônicos. Em géis de alginato, quando os grupos carboxilas estão ligados à Cu^{2+} ou NH_4^+ observa-se um deslocamento da banda em 1740 cm^{-1} para 1600 cm^{-1} (VALENTIN et al., 2005). Para as análises de FTIR e Raman, os polissacarídeos heteroramnana e quitosana foram analisados na forma de hidrogéis formados em solução de ácido acético com ácido bórico. Quando em equilíbrio, o íon borato é capaz de formar ligações éster com 1,2-diols (HENDERSON et al., 1973). As bandas relacionadas a ligações com o íon borato podem ser observadas na região próxima a 950 cm^{-1} , verificando-se uma pequena vibração atribuída as ligações B–OH ou B–O do ácido bórico (BETHELL; SHEPPARD, 1954; CHETRI et al., 2007), sugerindo, deste modo, a interação do íon borato com grupamentos livres (–OH, –COO) presente na heteroramnana, e provocando o deslocamento dos sinais.

4.1.2.2.2 Análise da Quitosana

O espectro de infravermelho da quitosana (Figura 13) apresentou vibrações características da molécula na região entre 3500 a 400 cm^{-1} . Os assinalamentos das bandas foram realizados de acordo com os previamente reportados na literatura (PAWLAK; MUCHA, 2003; CARDENA et al., 2004; ZAWADZKI; KACZMAREK, 2010; ZAJAC et al., 2015) e estão descritos na Tabela 5.

FIGURA 13. ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA QUITOSANA



Na região entre 3500 a 3000 cm^{-1} , observa-se uma forte e ampla banda, relacionada a sobreposição das vibrações dos grupos funcionais -OH , -NH e -COO livres que estão envolvidos em ligações de hidrogênio inter ou intramolecular. Na região entre 1700 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} foram observados bandas intensas características das unidades de GlcNH_2 e GlcNAc . A banda em 1639,1 cm^{-1} foi atribuída a vibrações da carbonila (C=O) da unidade de GlcNAc . Já a banda em 1537,44 cm^{-1} pode ser atribuída a grupos -NH_2 de amina primária de 2-aminoglicose não acetilado, assim como, para as ligações -NH das GlcNAc (PRANOTO et al., 2005).

A presença de grupos polares como -NH na estrutura da quitosana torna este polímero com características fortemente hidrofílicas (SHIGEMASA et al., 1996) e a absorção de água na amostra pode provocar o aumento de absorção nas bandas 3395,9 cm^{-1} , 3204,9 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} (ligação C=O do grupo amida I), resultando em um espectro complexo que pode sofrer variações conforme a análise (ZAWADZKI; KACZMAREK, 2010). Estes sinais podem estar sobrepostos uns aos

outros, visto que o -NH da amida pode interagir-se com o -COO- do ácido acético, formando ligações do tipo O=C-NHR , e, consequentemente, um aumento das bandas em $1639,1 \text{ cm}^{-1}$ (OSMAN; AROF, 2003).

Entre 1200 a 1000 cm^{-1} observa-se uma região bem saturada, em termos do número de bandas, que pode estar sofrendo influência da presença de três modos vibracionais distintos, entre eles a vibrações da ligação C-O-C de ligações glicosídicas, que foram atribuídas as bandas em $1152,16/1067,8 \text{ cm}^{-1}$, e a vibração das ligações C-OH e C-C da cadeia principal (MUCHA et al., 1999). Além das interações intramoleculares da quitosana, as vibrações relacionadas as ligações intermoleculares, como as ligações do íon borato à grupamentos livres presentes na quitosana (-OH , -NH_2), podem influenciar esta região.

O aspecto da quitosana e o modo como é analisada são fatores que podem influenciar no espectro gerado. Brugnerotto e colaboradores (2001) analisaram a quitina na forma de filmes ou *pellet*, sendo o último, o que demonstrou um espectro com sinais mais evidentes. Formas não uniforme podem influenciar na penetração e no modo de evasão da radiação sobre a amostra. A forma de filmes finos uniformes com poucas imperfeições pode gerar espectros com mais qualidades, no entanto, testes experimentais devem ser levados em conta (NURDIN et al., 1998).

TABELA 5. ASSINALAMENTOS DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO E RAMAN DA QUITOSANA E HETERORAMNANA

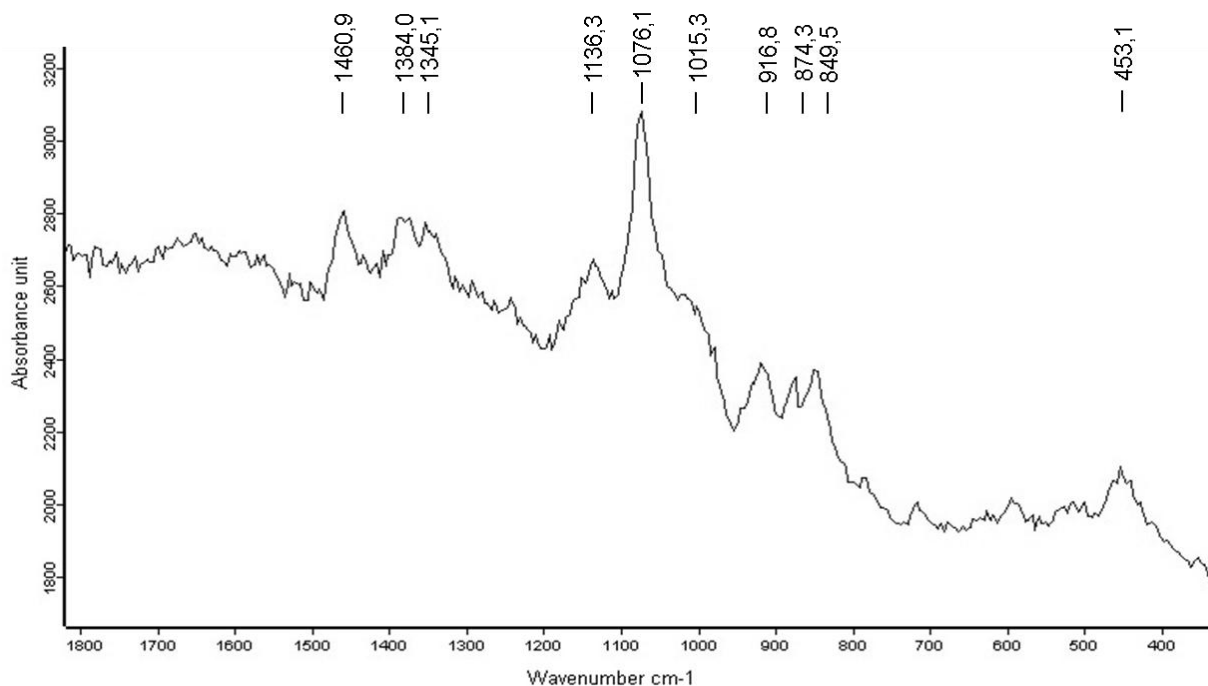
Quitosana			Heteroramnana		
Assinalamentos	FTIR (cm ⁻¹)	RAMAN (cm ⁻¹)	Assinalamentos	FTIR (cm ⁻¹)	RAMAN (cm ⁻¹)
-OH, -COO (ligações de hidrogênio)	3395,9 3204,9		-OH, -COO (ligações de hidrogênio)	3377,5 3228,0	
-CH₂ (vibrações simétricas e assimétricas atribuídos a cadeia principal)	2946,9 2882,8 1406,2 1382,5 1261,3	1419,4	-CH₂ (vibrações simétricas e assimétricas atribuídos a cadeia principal)	2939,9	1460,9
C=O, C=N (grupo amida, grupo amina)	1639,1	1649,5	C=O (ácido urônico)	1637,9 1399,6	
-NH, -NH₂ (vibrações do grupo amida, amina)	1537,4	1574,0			
-CH, -OH (vibrações atribuídas a cadeia principal)	1406,2 1307,7	2931,7 2897,8	-CH, -OH		2981,2 2940,8 1345,1
-CH₃ (grupo amida)	1382,5				
C-O	1261,3		C-O-S	1218,2 830,4 759,3	1345,1 1136,3 874,3 849,5
C-O-C (ligação glicosídica)	1152,1 1067,8	1123,3 1061,1	C-O-C (ligação glicosídica)	1045,4	1136,3 1076,1
B-OH ou B-O (ácido bórico)	1067,8 947,7	1419,4 481,4	B-OH ou B-O (ácido bórico)	1045,4 919,4	1460,9 453,1
C-N	947,7				

4.1.2.3 Caracterização por RAMAN

4.1.2.3.1 Análise do Extrato Gb1

O espectro de infravermelho por Raman do extrato Gb1 apresentou vibrações características de carboidratos observadas na região entre 1500 a 800 cm⁻¹ (Figura 14). Os assinalamentos das bandas do espectro foram comparados com estudos descritos na literatura com diferentes tipos de polissacarídeos de algas marinhas (MATSUHIRO, 1996; PEREIRA et al., 2009) e podem ser vistos com mais detalhe na tabela 5

FIGURA 14. ESPECTRO DE INFRAVERMELHO POR RAMAN DA HETERORAMNANA DO EXTRATO Gb1



As metodologias de espectroscopia FTIR e Raman são baseadas conforme a medição da vibração molecular, no entanto, não proporcionam exatamente as mesmas informações. Na espectroscopia por FTIR as vibrações são detectadas quando ocorrem mudanças no momento dipolo elétrico, enquanto que a espectroscopia Raman detecta as vibrações quando a polaridade elétrica muda. Neste sentido, FTIR acaba sendo mais eficiente para detectar a vibração de grupos laterais, enquanto que o Raman se torna uma técnica mais sensível para as vibrações da cadeia principal (SALOMONSEN et al., 2008).

O espectro gerado pela heteroramnana apresentou picos esparsos com bandas sobrepostas. Na região próxima a 2900 cm⁻¹ foi possível observar uma banda intensa que foi relacionada as vibrações das ligações dos grupos CH (resultado não demonstrado na figura). Observaram-se três bandas na região entre 1500 a 1300 cm⁻¹, que foram correlacionadas com as ligações do grupo CH₂ acoplado a vibrações simétricas de C–OH, C–O e C–H. As vibrações das ligações glicosídicas foram identificadas através da banda 1076,1 cm⁻¹, e as ligações relacionadas ao grupamento sulfato às bandas 874,3 e 849,5 cm⁻¹. Também foram observadas absorbâncias relativas as vibrações das ligações B–OH e B–O referentes ao ácido bórico em 1460,9 e 453,1 cm⁻¹, respectivamente (BETHELL; SHEPPARD, 1954).

O espectro apresentou regiões densas, havendo sobreposição de bandas, podendo estar correlacionado com mais de um tipo de vibração de ligação da molécula. Na região em 1300 cm^{-1} observa-se a presença de duas bandas que podem estar relacionados a vibrações simétricas de C–OH e C–O. A banda em $1345,1\text{ cm}^{-1}$ também poderia estar relacionada a vibrações assimétricas do grupamento SO_2 (CONLEY et al., 1966), assim como a banda em $1136,3\text{ cm}^{-1}$ pode ser correlacionado as vibrações das ligações C–O–C e C–O–S.

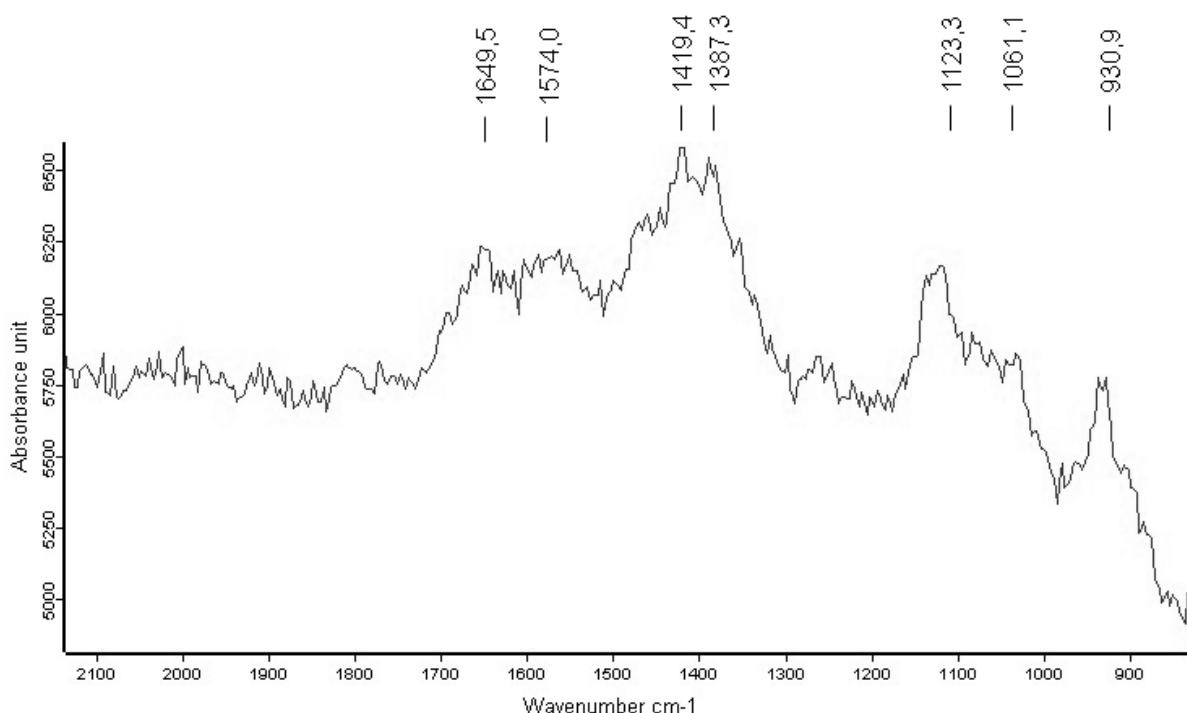
A espectroscopia de infravermelho Raman pode utilizar como fonte de excitação das moléculas lasers emitindo luz monocromática na faixa entre 532 a 785 nm. O laser que gerou o melhor espectro e que foi utilizado para as análises foi o verde (emite na faixa de 532 nm). No entanto, como será observado mais adiante nas análises de Microscopia Confocal por imunofluorescência, os hidrogéis analisados apresentaram autofluorescência nas faixas dos lasers visíveis, com diferentes intensidades, o que pode ser um fator impactante na geração dos espectros. O uso de lasers operando em faixas distantes dos lasers visíveis (1064 nm) em espectrômetros interferométricos tem demonstrado diminuir o nível de fluorescência, assim como evitar a degradação da amostra (PEREIRA et al., 2009).

Em grande parte das bandas observadas na espectroscopia Raman, as magnitudes das frequências de absorção foram correspondentes as frequências geradas no FTIR, demonstrando serem métodos complementares para a caracterização estrutural das heteroramnanas. Desta forma, a partir da análise utilizando espectroscopia Raman confirmam-se os principais grupamentos presentes nas heteroramnanas, de acordo com o que foi observado a partir das análises por RMN e FTIR.

4.1.2.4 Análise da Quitosana

A análise por espectroscopia Raman da quitosana apresentou vibrações características da molécula na região entre 1700 a 800 cm^{-1} (Figura 15). Os assinalamentos das bandas foram realizados de acordo com os previamente descritos na literatura (ZHANG et al., 2011; ZAJAC et al., 2015) e são apresentados na Tabela 5.

FIGURA 15. ESPECTRO DE INFRAVERMELHO POR RAMAN DA QUITOSANA



Na análise da quitosana por Raman, o espectro gerado apresentou bastante ruído, com picos esparsos, complexos e bandas sobrepostas, sendo possível correlacionar somente as principais bandas citadas na literatura. Na região próxima a 2900 cm^{-1} foi possível observar duas bandas evidentes, que foram relacionadas as vibrações das ligações dos grupos CH e CH₂ (resultados não demonstrado na figura). Também foram correlacionadas as vibrações simétricas e assimétricas dos grupos CH₃, CH₂ e CH com as bandas presentes na região próxima a 1400 cm^{-1} , sendo a banda $1387,3$ atribuída a cadeia principal da quitosana (ZHANG et al., 2011).

As bandas observadas na região de absorção entre 1500 a 1400 cm^{-1} foram relacionadas a vibrações das ligações C–N de aminas primárias, sendo que a banda $1574,0\text{ cm}^{-1}$ foi atribuída as vibrações das ligações –NH₂. A banda $1649,5\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída tanto as vibrações das ligações C=O do grupamento acetila, como das ligações C–N do grupamento amino. Entre 1050 a 1200 cm^{-1} atribui-se a região de alongamentos C–C, sendo as bandas $1123,3$ e $1061,1\text{ cm}^{-1}$ relacionado as vibrações simétricas de C–O–C das ligações glicosídicas. Desta forma, a partir da análise utilizando espectroscopia Raman confirmam-se os principais grupamentos presentes na quitosana, de acordo com o que foi observado a partir das análises por RMN e FTIR.

4.1.2.5 Determinação do Grau de Acetilação (DA) da Quitosana

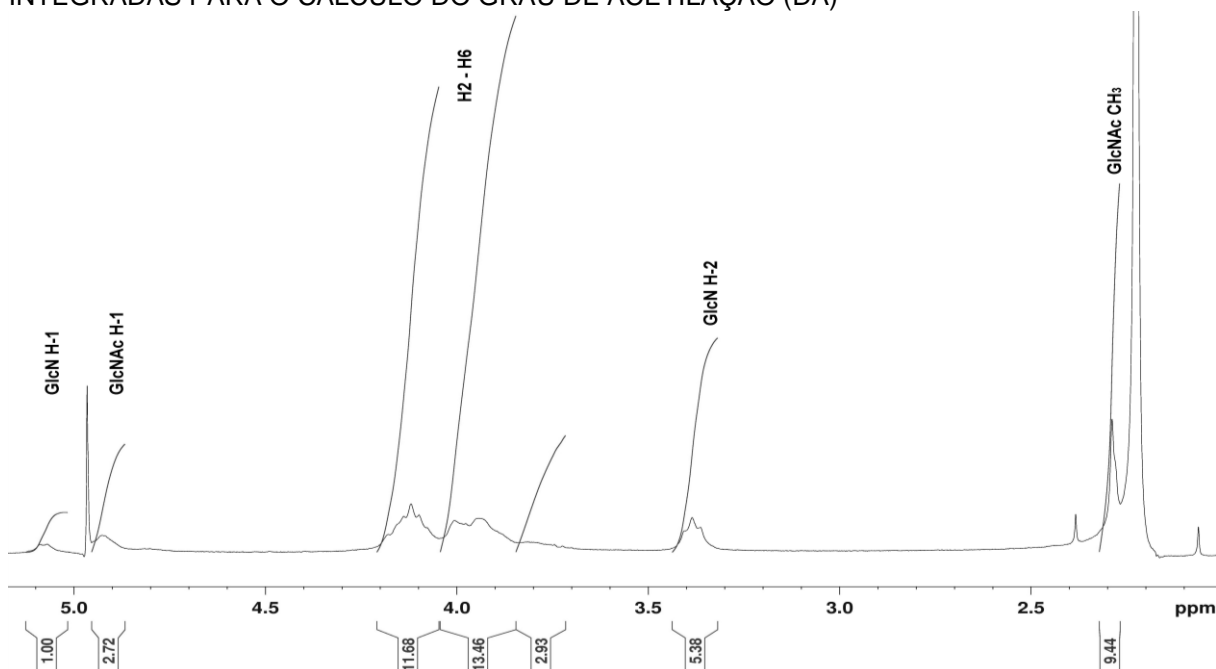
Um dos parâmetros importantes na caracterização da quitosana é o grau de acetilação (DA), o qual influencia diretamente na solubilidade e no caráter polieletrólítico do polímero. A determinação do grau de acetilação ou desacetilação da quitosana vem sendo evidenciada por diferentes métodos, como por RMN de ^{13}C e ^1H (RINAUDO et al., 1993; HEUX et al., 2000; LAVERTU et al., 2003; FERNANDEZ-MEGIA et al., 2005), Raman (ZAJAC et al., 2015), FTIR (BAXTER et al., 1991; DUARTE et al., 2002) e outros (MUZARELLI et al., 1986; TSAIH; CHEN, 1999). Para determinar o grau de acetilação da quitosana utilizada neste trabalho, foram empregadas as técnicas de RMN de ^{13}C e ^1H .

A partir das regiões integradas demarcadas no espectro de RMN de ^1H da quitosana (Figura 16), o grau de acetilação foi calculado a partir da seguinte equação:

$$\text{DA} = 100 \times (\int \text{H1 GlcN}) \div (\int \text{H1 GlcN} + \int \text{H1 GlcNAc})$$

sendo, $\int \text{H1 GlcN}$ a área relativa do H-1 das unidades de glucosamina, e $\int \text{H1 GlcNAc}$ a área relativa do H-1 das unidades de N-acetil glucosamina. Este método foi selecionado devido a presença de ácido acético na amostra. Como proposto por Lavertu e colaboradores (2003), a presença do ácido acético interfere nos sinais gerados, provocando a sobreposição das ressonâncias referentes aos hidrogênios do anel (H-2 até H-5) na região entre 4,2 e 3,8 ppm, e desta forma, os métodos que utilizam os sinais referentes ao H-2 das unidades de GlcN e GlcNAc, como o proposto por Shigemasa e colaboradores (1996), tornam-se inviáveis. Por essa razão foi utilizado o método que envolve apenas as áreas dos hidrogênios anoméricos. Aplicando a fórmula apresentada acima, a quitosana apresentou 26,9% da sua estrutura acetilada (DA= 26,9).

FIGURA 16. ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA QUITOSANA DEMARCANDO AS REGIÕES INTEGRADAS PARA O CÁLCULO DO GRAU DE ACETILAÇÃO (DA)



O grau de acetilação da quitosana a partir da técnica de RMN de ^1H também pode ser determinado correlacionando diferentes sinais. Como comparação, o método proposto por Sato e colaboradores (1998) foi utilizado, sendo calculado o grau de acetilação (DA) a partir da seguinte equação:

$$DA = 100 \times \left(\int H1 \text{GlcN} + \frac{\int CH3}{3} \right) \div \left(\int H1 \text{GlcN} + \int H2 + \int H1 \text{GlcNAc} + \int CH3 \right)$$

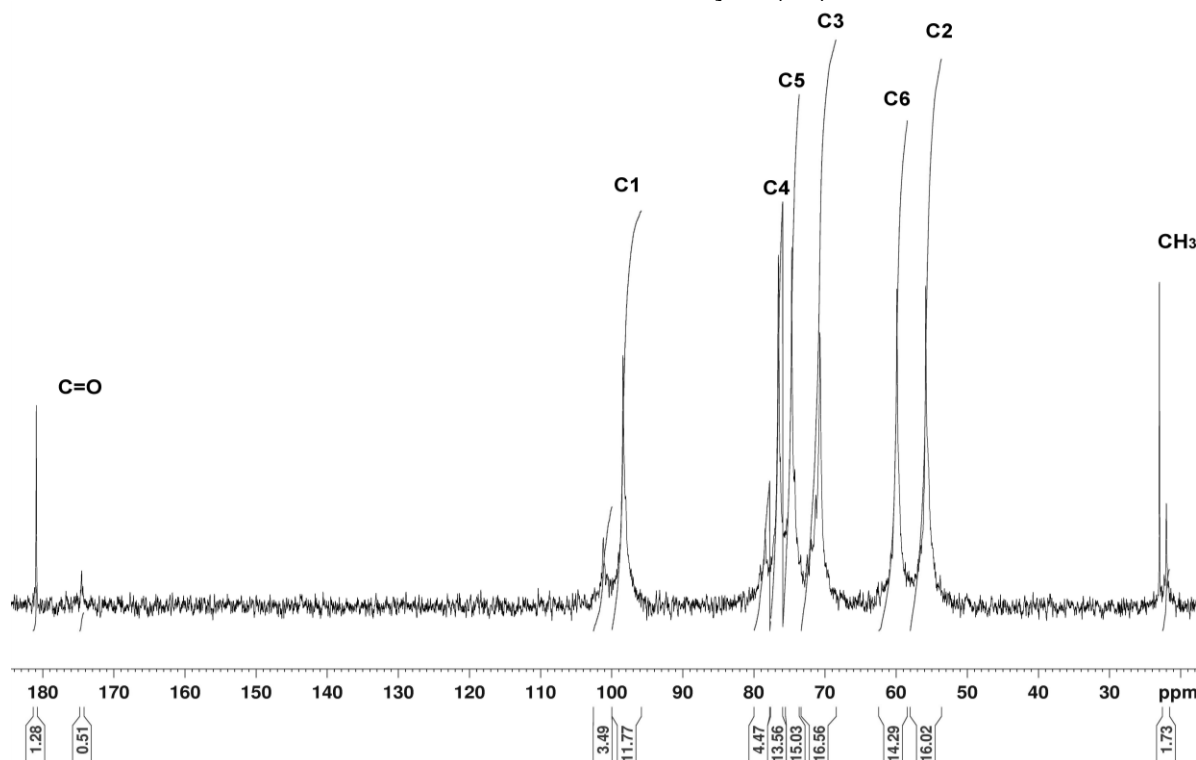
sendo, H1 GlcN referente ao H-1 das unidades de glucosamina, H1 GlcNAc referente ao H-1 das unidades de N-acetil glucosamina, H2 referente ao H-2 das unidades de glucosamina e CH3 referente ao metil das unidades de N-acetil glucosamina. A vantagem de usar o pico do metil em relação aos outros picos ressonantes, se deve a alta intensidade do sinal que facilita na sua identificação (KASAAI, 2010). Por este método, a quitosana apresentou 22,3% da sua estrutura acetilada. Os resultados obtidos a partir destes métodos utilizando as análises de RMN de ^1H , demonstraram semelhanças no grau de acetilação da amostra.

O DA da quitosana também foi determinado utilizando as análises de RMN de ^{13}C (Figura 17), a partir da seguinte equação (DUARTE et al., 2002):

$$DA = 100 \times \int CH3 \div \left[\frac{1}{6} \left(\int C1 + \int C2 + \int C3 + \int C4 + \int C5 + \int C6 \right) \right]$$

sendo, CH₃ referente ao metil das unidades de N-acetil glucosamina, C1, C2, C3, C4, C5 e C6 referentes aos átomos de carbono do anel da glucosamina. Por este método, a quitosana utilizada apresentou 12,1% da sua estrutura acetilada. O átomo de carbono do grupo carbonila (C=O) também poderia ser utilizado para calcular o grau de acetilação da quitosana, no entanto, o tempo de relaxamento mais longo do núcleo deste carbono, pode fornecer valores subestimados (OTTØY et al., 1996). Comparando com os resultados obtidos a partir das análises de RMN de ¹H, observa-se que o grau de acetilação foi menor na análise por RMN de ¹³C. A sensibilidade do método por ressonância magnética nuclear depende diretamente dos núcleos, da concentração e do meio químico no qual se encontram (NEISS, 2000), e deste modo, as análises de RMN de ¹³C e ¹⁵N apresentam menor sensibilidade quando comparados ao de ¹H, em razão da baixa abundância natural ¹³C e ¹⁵N (KASAAI, 2010).

FIGURA 17. ESPECTRO DE RMN DE ¹³C DA QUITOSANA DEMARCANDO AS REGIÕES INTEGRADAS PARA O CÁLCULO DO GRAU DE ACETILAÇÃO (DA)



A determinação do grau de acetilação da quitosana por análises de RMN é considerada um dos métodos mais precisos e confiáveis, quando comparados a outros. No entanto, diversos parâmetros podem influenciar na análise, como a

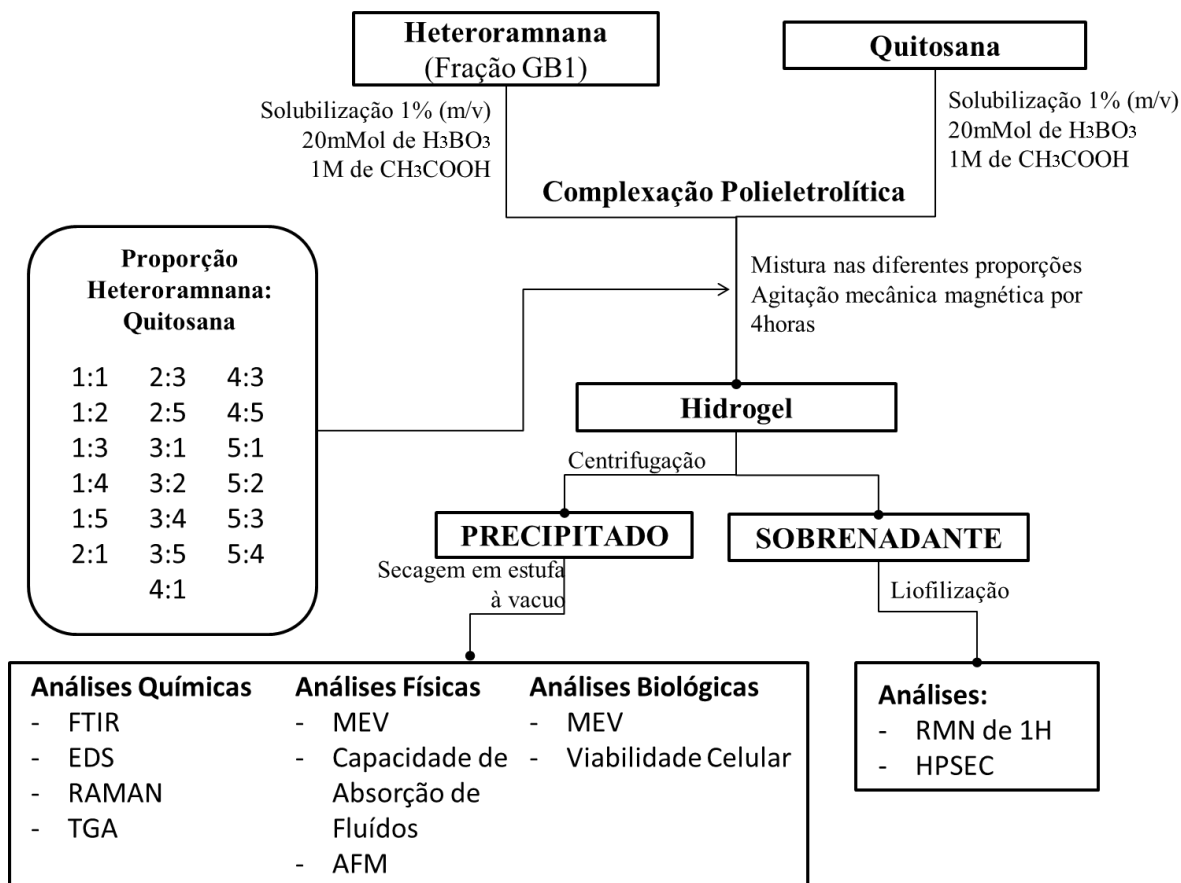
temperatura, o solvente utilizado, o tempo de relaxamento, e outros fatores (KASAAI, 2010). Desta forma, a organização *American Standard Test Method* (ASTM) atribuiu a espectroscopia de RMN de ^1H como o método padrão para determinar o grau de acetilação da quitosana (ASTM, 2012). Visto os diversos parâmetros que podem influenciar na análise para determinar o DA da quitosana, a comparação com mais de uma técnica pode ser uma forma de confirmar a composição da amostra desejada. A partir das análises de RMN de ^{13}C e ^1H realizadas, podemos sugerir que a quitosana utilizada para o desenvolvimento dos hidrogéis possui aproximadamente 20% da sua estrutura acetilada.

O grau de acetilação da quitosana é um parâmetro estrutural que esta diretamente relacionado com a densidade de carga, solubilidade e a propensão à degradação enzimática (TOMIHATA; IKADA, 1997). No desenvolvimento de biomateriais, o grau de acetilação da quitosana é um parâmetro essencial para o entendimento da formação das estruturas químicas, e também de possíveis respostas biológicas geradas pela interação entre as células e o biomaterial. Neste aspecto, é de suma importância determinar o grau de acetilação da quitosana utilizada no estudo.

4.2 DESENVOLVIMENTO DOS HIDROGÉIS

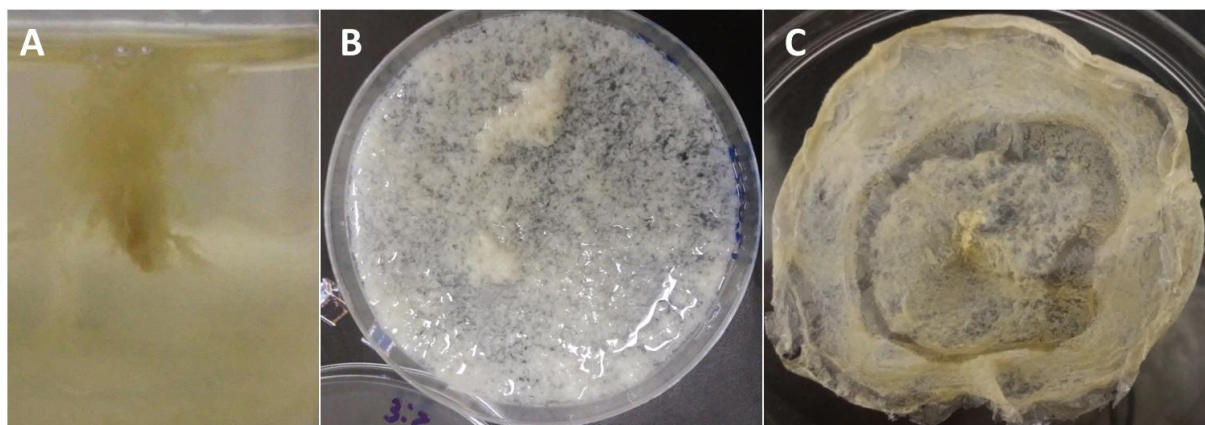
O desenvolvimento dos hidrogéis foi realizado conforme descrito no fluxograma apresentado na Figura 18.

FIGURA 18. FLUXOGRAMA DO DESENVOLVIMENTO DOS HIDROGÉIS A PARTIR DAS HETERORAMNANAS ISOLADAS DE *G. brasiliensis* COM A QUITOSANA



Para o desenvolvimento dos hidrogéis foi utilizado o extrato Gb1 extraída a partir da *Gayralia brasiliensis* e a quitosana (Sigma Aldrich). Após manter as misturas sob agitação, verificou-se a precipitação e formação de grumos irregulares transparentes a esbranquiçados. Os hidrogéis formados, denominados de hidrogéis HQ conforme a proporção de heteroramnana:quitosana, foram separados por centrifugação, gerando um precipitado e sobrenadante. Este último foi submetido ao processo de liofilização e análises posteriores de RMN de ¹H e homogeneidade por HPSEC-MALLS. O precipitado contendo o hidrogel formado foi seco em estufa a vácuo e submetido a análises químicas, físicas e biológicas (Figura 19).

FIGURA 19. HIDROGÉIS FORMADOS POR DIFERENTES PROPORÇÕES DE HETERORAMNANA:QUITOSANA



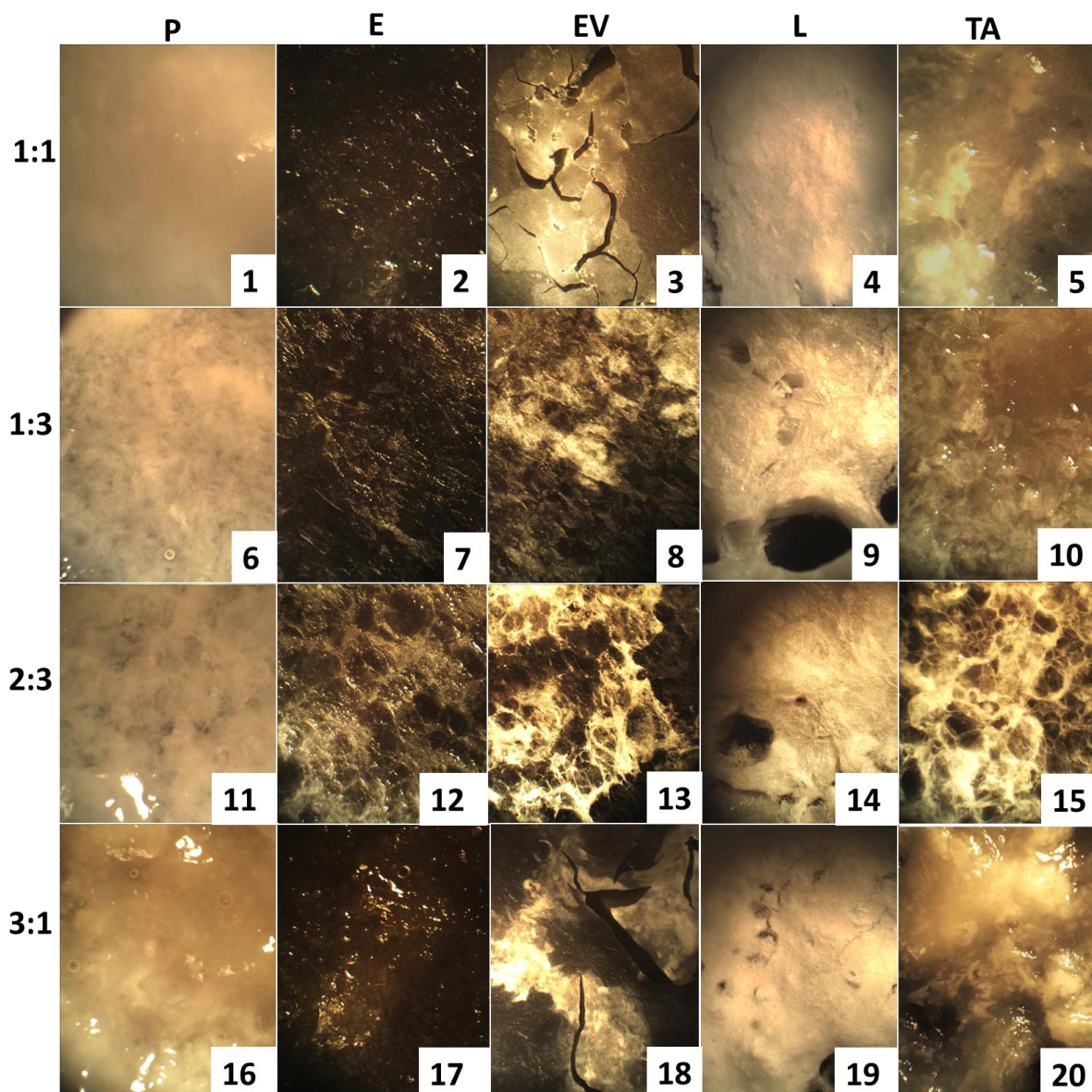
A) Hidrogel HQ formado na proporção 1:4 após a mistura entre os polissacarídeos, ainda em solução. B) Hidrogel HQ formado na proporção 3:2, após centrifugação. C) Hidrogel HQ formado na proporção 2:1 após o processo de secagem à vácuo.

O processo de secagem de soluções poliméricas envolvendo o desenvolvimento de produtos poliméricos como fibras sintéticas, filmes fotográficos, entre outros, envolve critérios complexos de transferência de massa, temperatura, solvente e pressão, e que influenciam nas características finais do produto (VRENTAS; VRENTAS, 1994; DABRAL et al., 2002; HO et al., 2004). Durante o processo para o desenvolvimento dos hidrogéis, foram analisadas diferentes condições para a secagem e conservação das amostras. Os hidrogéis formados foram liofilizados, secos em temperatura ambiente, em estufa com temperatura a 37°C e à vácuo. A partir desses testes, verificou-se através de lupa (aumento de 40x) que a secagem do biomaterial pelo processo com estufa à vácuo e a temperatura ambiente foi o que melhor manteve a estrutura macroscópica (Figura 20).

A secagem em temperatura ambiente (Imagens 5, 10, 15 e 20), apesar de manter o aspecto estrutural inicial, não mostrou ser um método apropriado por razões de tempo e eficiência. Os hidrogéis permaneceram secando em temperatura ambiente durante 14 dias, e após este período, ainda era possível verificar umidade no material. Durante este tempo, aumenta-se a chance de contaminação das amostras por micro-organismos como bactérias ou fungos. Os métodos de secagem mais rápidos foram os que melhor mantêm as condições para prevenir a formação de cadeias poliméricas (SEARLES et al., 2001; LEE; CHENG, 2006). Dagalakakis e colaboradores (1980) observaram que a secagem em temperatura ambiente, apesar de ser o procedimento mais fácil e barato, é inviável por provocar alterações

estruturais e volumétricas significativas, verificando uma redução no tamanho dos poros.

FIGURA 20. HIDROGÉIS FORMADOS NAS PROPORÇÕES DE HETERORAMNANA:QUITOSANA 1:1, 1:3, 2:3 E 3:1 SECOS POR DIFERENTES METODOLOGIAS DE SECAGEM



As Imagens 1, 6, 11 e 16 representam os hidrogéis HQ 1:1, 1:3, 2:3 e 3:1, respectivamente, após a obtenção por centrifugação; as Imagens 2, 7, 12 e 17 representam os hidrogéis secos em estufa com temperatura à 37°C (E); as Imagens 3, 8, 13 e 18 representam os hidrogéis secos em estufa à vácuo (EV); as Imagens 4, 9, 14 e 19 representam os hidrogéis secos por liofilização (L); as Imagens 5, 10, 15 e 20 representam os hidrogéis secos em temperatura ambiente (TA). Imagens observadas em lupa em um aumento de 40x.

Os outros métodos de secagem testados, em estufa à 37°C (Imagens 2, 7, 12 e 17) e por liofilização (Imagens 4, 9, 14 e 19), demonstraram alterar a estrutura macroscópica do material. O aumento de temperatura no processo de secagem

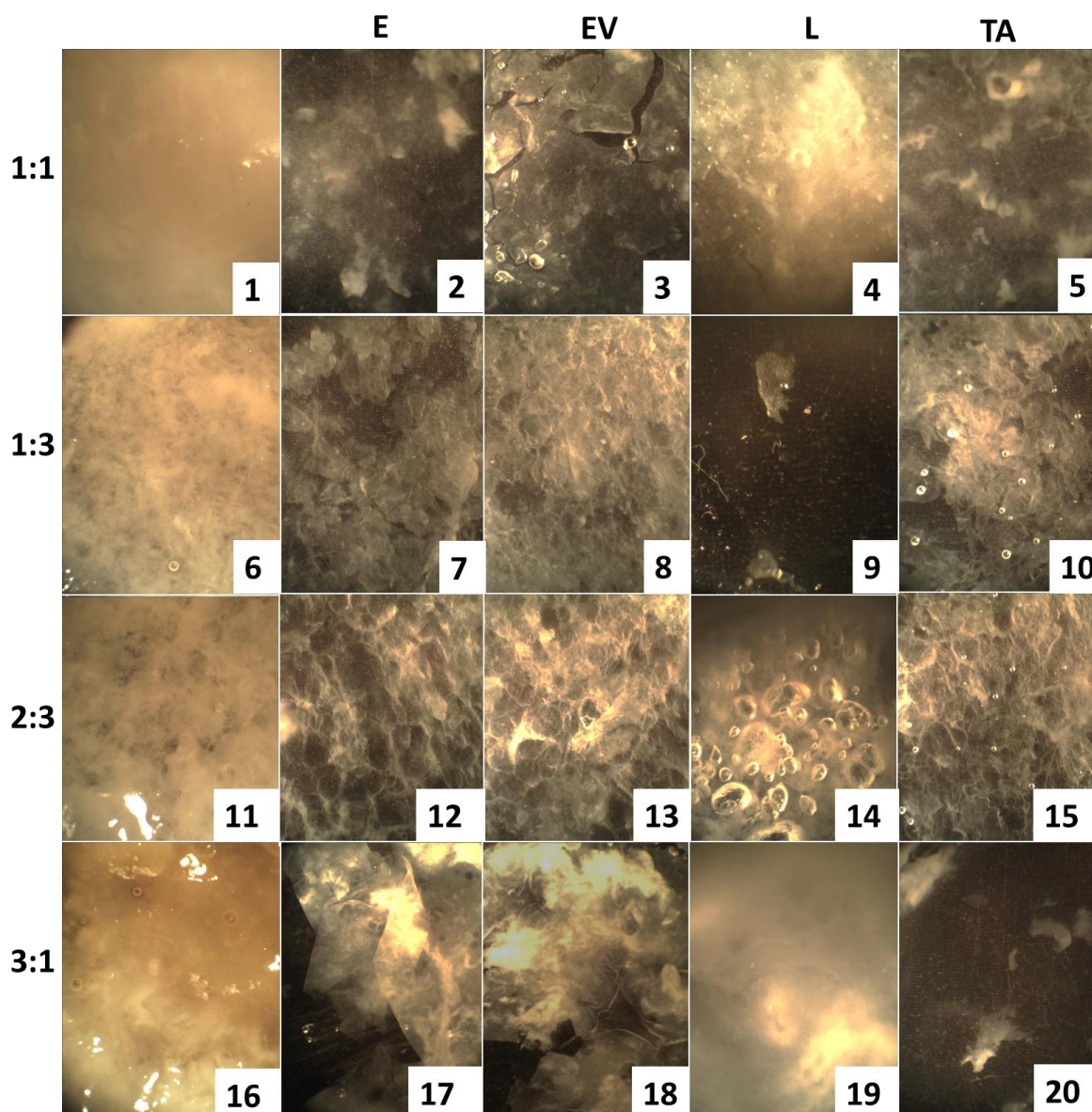
pode promover a remistura da solução separada em fases, ou também, a fusão do material, provocando a destruição de estruturas porosas. Em compensação, o processo por liofilização pode prevenir a desintegração de estruturas porosa, porém, se as baixas temperaturas não são controladas corretamente, a matriz polimérica pode não estar rígida o suficiente para resistir a tensão interfacial causada pela evaporação do solvente (HO et al., 2004).

Em estudo desenvolvido com membranas de celulose produzidos a partir de bactérias, foram analisadas diferentes características (permeabilidade, força mecânica e constituição química) e suas alterações conforme diferentes métodos de secagem testados (evaporação em estufa à 60°C, liofilização e em temperatura ambiente). A partir das análises realizadas, verificou-se que as membranas submetidas a liofilização e a evaporação com temperatura apresentaram uma diminuição na permeabilidade das membranas, principalmente aquelas submetidas a evaporação com temperatura. Observou-se que os materiais secos apresentaram mudanças na sua composição química, demonstrando que o fator temperatura promove reações químicas que podem alterar a estrutura do material (CLASEN et al., 2006).

Em membranas de colágeno e glucosaminoglucana, observou-se possíveis mudanças em decorrência dos diferentes tratamentos de secagem (temperatura ambiente, liofilização e ponto crítico). A secagem por liofilização foi o método que provocou menos alterações no tamanho dos poros e na estrutura das membranas (DAGALAKIS et al., 1980). Em outro estudo com membranas de gelatina/amido/hidroxiapatita, verificou-se que a membrana seca por liofilização, apresentava uma diminuição irreversível do tamanho dos poros, mesmo após a reidratação do material, afetando na sua aplicabilidade (JAYA et al., 2009). Observa-se que o método de secagem, a amostra, o solvente utilizado, e outras condições físico-químicas, influenciam nas características originais do material a ser tratado.

Outro fator determinante para a escolha do método de secagem a ser utilizado, foi o aspecto macroscópico da estrutura obtida após 48 h de reidratação dos hidrogéis secos pelos diferentes métodos, em tampão fosfato 0,1 M. Observou-se que nenhum dos métodos testados permitiu que os hidrogéis retornassem a sua forma original, no entanto, as amostras secas em temperatura ambiente e em estufa à vácuo foram as que demonstraram recuperar o mais próximo a sua forma original (Figura 21).

FIGURA 21. HIDROGÉIS HQ 1:1, 1:3, 2:3 E 3:1 SECOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE SECAGEM E REIDRATADOS COM TAMPÃO PBS POR 48H



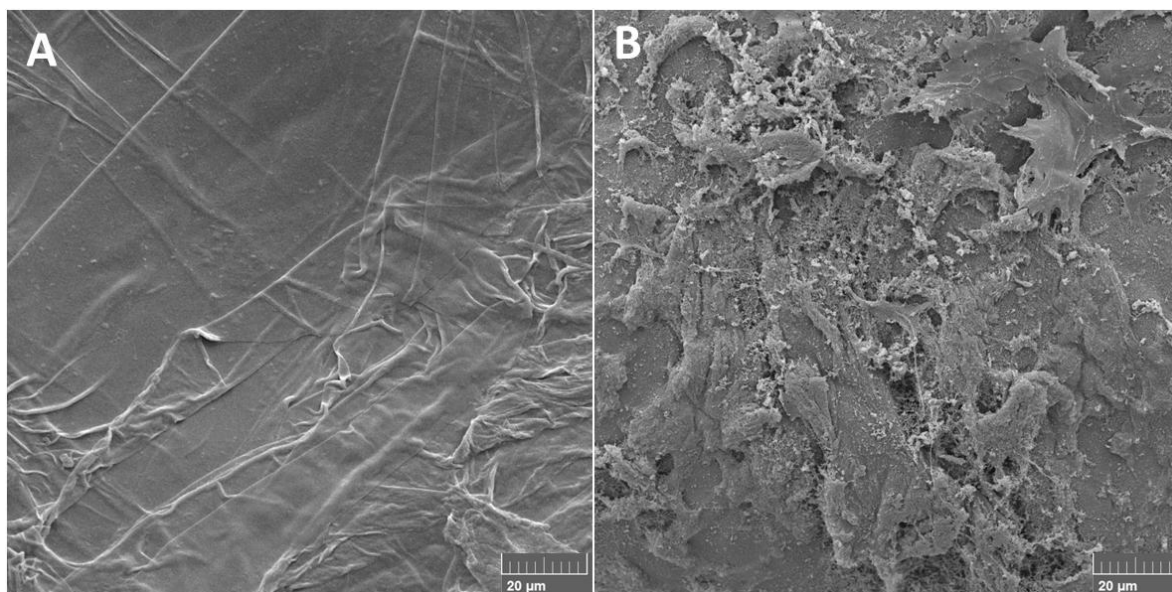
As Imagens 1, 6, 11 e 16 representam os hidrogéis HQ 1:1, 1:3, 2:3 e 3:1, respectivamente, após a obtenção por centrifugação; as Imagens 2, 7, 12 e 17 representam os hidrogéis secos em estufa com temperatura à 37°C seguida da reidratação (E); as Imagens 3, 8, 13 e 18 representam os hidrogéis secos em estufa à vácuo seguida da reidratação (EV); as Imagens 4, 9, 14 e 19 representam os hidrogéis secos por liofilização seguida da reidratação (L); as Imagens 5, 10, 15 e 20 representam os hidrogéis secos em temperatura ambiente seguida da reidratação (TA). Imagens observadas em lupa em um aumento de 40x.

Após a reidratação, verificou-se que os hidrogéis HQ 1:1 secos em estufa com temperatura (Imagem 2) e em temperatura ambiente (Imagem 5), assim como os hidrogéis HQ 1:3 seco por liofilização (Imagem 9) e 3:1 seco em estufa com temperatura (Imagem 17) sofreram a ressolubilização em tampão após 48 h de reidratação em temperatura ambiente. Para aplicações na engenharia de tecidos

como biomateriais, a estabilidade do hidrogel é uma característica relevante e que deve ser levada em consideração, e neste aspecto, os hidrogéis que perderam a sua estrutura original demonstraram serem inviáveis para tal. O método de secagem em estufa à vácuo (Imagem 3, 8, 13 e 18) foi o único procedimento em que não se observou a ressolubilização dos hidrogéis testados.

A estrutura dos hidrogéis também foi avaliada por análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Comparando através das análises de MEV a estrutura dos hidrogéis secos em estufa à vácuo e por ponto crítico, é possível observar características distintas entre eles (resultados não apresentados). No hidrogel HQ 4:3 é possível observar que quando o material é seco em estufa à vácuo, este perde a sua estrutura tridimensional (Figura 22 A). E quando seco por ponto crítico a estrutura tridimensional é mantida (Figura 22 B).

FIGURA 22. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL POR MEV DA SUPERFÍCIE DO HIDROGEL HQ 4:3



Hidrogel 4:3 seco em estufa à vácuo (A) e por ponto crítico (B). Aumento de 2000x.

O processo de secagem por ponto crítico ocorre através da substituição gradual entre o etanol e o gás carbônico liquefeito. O CO_2 é lentamente aquecido, ocorrendo a transição da fase líquida para a gasosa. Sob uma pressão acima de 73 atm e temperatura de 31°C (pressão e temperatura crítica do CO_2 , respectivamente), a densidade da fase líquida iguala a da fase gasosa, a tensão superficial é zero, ocorrendo a secagem da amostra sem o efeito de forças atuantes de tensão superficial (CASTRO, 2002). Deste modo, a secagem por ponto crítico não provoca

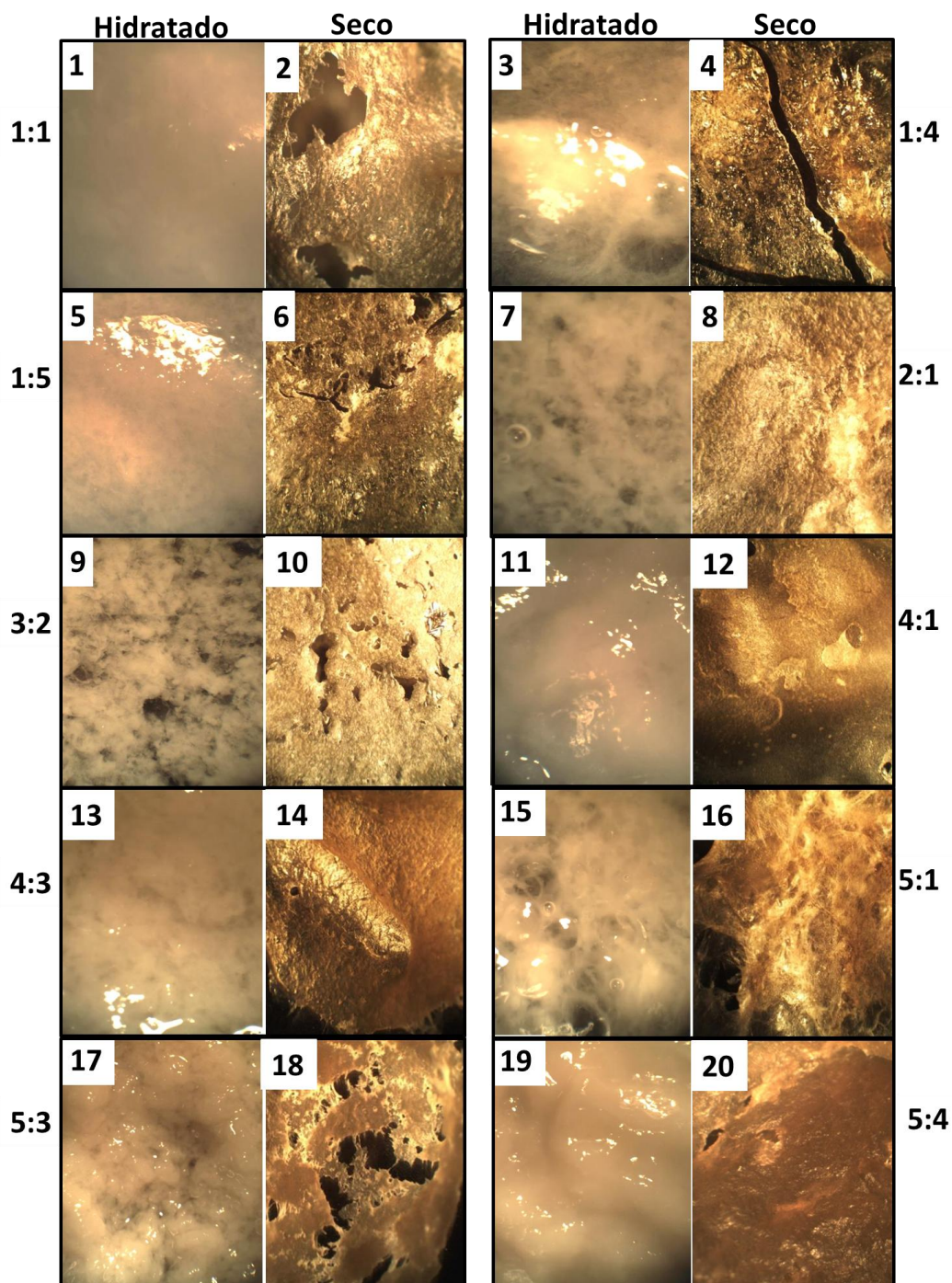
o rompimento das estruturas, mantendo o mais próximo das características originais. Em compensação, o processo de secagem por estufa à vácuo, não possui um controle coordenado de temperatura e pressão, promovendo uma lenta evaporação do solvente durante o processo e que pode provocar o rompimento das estruturas internas formadas, ocasionando a perda da estrutura tridimensional dos hidrogéis. Nam e colaboradores (2000) observaram evento similar com membranas formadas a partir de ácido polilático (PLLA).

Nos estudos realizados por Thomson e colaboradores (1995), foram desenvolvidas membranas de ácido polilático-co-glicólico (PLGA) secos em estufa à vácuo. Observou-se que a membrana formada apresentou uma estrutura porosa, com tamanhos variados, alta degradabilidade e apresentando baixa capacidade de resistir a força de compressão, não sendo aplicável para o desenvolvimento do osso trabecular, como o estudo propôs. Contudo, o autor propõe que o material desenvolvido serve de base para o desenvolvimento de biomateriais para a regeneração óssea.

Na patente depositada por Hostettler e colaboradores (2000), também foi utilizado a secagem em estufa à vácuo como o método para a retirada do solvente e conservação do hidrogel desenvolvido a partir de poliuretano. O biomaterial desenvolvido demonstrou capacidade de retomar a sua forma original, quando reidratado com água ou solução salina, além de demonstrar alta capacidade de aderência a diversos substratos, sugerindo potencialidade para ser aplicado em diferentes tipos de dispositivos médicos, como cateteres, fios guia, tubos metálicos e outros.

A secagem por ponto crítico foi o método que mais demonstrou manter as características originais do hidrogel formado. No entanto, é uma técnica de alto custo, e sua aplicação tem sido mais voltada para o preparo de amostras para análises de microscopia eletrônica (SMITH; FINKE, 1972; BRAET et al., 1997). A partir das análises macro e microscópicas, observa-se que a estrutura dos hidrogéis secos por diferentes métodos são alteradas. A formação de diferentes estruturas pode permitir o uso do material desenvolvido para diferentes aplicações. Após análise dos rendimentos (apresentado na seção a seguir) e dos diferentes aspectos macroscópicos observados quando hidratados e após secos em estufa à vácuo, foram selecionados para posterior análises, dentre todas as combinações testadas, os seguintes hidrogéis: 1:1, 1:4, 1:5, 2:1, 3:2, 4:1, 4:3, 5:1, 5:3, 5:4 (Figura 23).

FIGURA 23. ASPECTO MACROSCÓPICO DOS HIDROGÉIS HQ SELECIONADOS PARA ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICAS



As Imagens 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19 representam os hidrogéis hidratados 1:1, 1:4, 1:5, 2:1, 3:2, 4:1, 4:3, 5:1, 5:3 e 5:4 respectivamente; enquanto que as Imagens 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 representam os hidrogéis 1:1, 1:4, 1:5, 2:1, 3:2, 4:1, 4:3, 5:1, 5:3 e 5:4 secos em estufa à vácuo, respectivamente. Imagens observadas em lupa em um aumento de 40x.

4.2.1 Rendimento dos Hidrogéis HQ Formados

A formação do hidrogel HQ ocorre devido a interação eletrostática entre as cargas presentes nos polissacarídeos, e a fim de verificar o melhor rendimento de hidrogel formado a partir desta interação, foram desenvolvidos hidrogéis com diferentes concentrações de heteroramnana:quitosana (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 2:3, 2:5, 3:1, 3:2, 3:4, 3:5, 4:1, 4:3, 4:5, 5:1, 5:2, 5:3, 5:4). Os rendimentos podem ser verificados na tabela a seguir (Tabela 6).

TABELA 6. RENDIMENTO DOS HIDROGÉIS FORMADOS NAS DIFERENTES PROPORÇÕES DE HETERORAMNANA:QUITOSANA

Pré secagem ^a			Rendimento Final ^b
H:Q	% (P/V) Sobrenadante	% (P/V) Precipitado	% (P/P) Hidrogel
1:1	90,0	7,8	36,0
1:2	87,0	9,2	40,8
1:3	87,0	7,3	20,3
1:4	76,7	3,8	18,0
1:5	90,4	4,0	13,5
2:1	28,7	69,5	89,1
2:3	71,7	20,6	48,2
2:5	89,0	6,4	31,8
3:1	88,98	7,8	44,9
3:2	54,9	41,3	86,8
3:4	52,5	42,0	69,4
3:5	88,7	8,3	42,6
4:1	89,7	7,7	45,7
4:3	75,5	20,3	78,9
4:5	83,4	10,5	56,8
5:1	79,0	18,0	23,1
5:2	59,7	37,1	68,2
5:3	86,6	9,7	81,0
5:4	90,0	8,1	69,6

^a Representa a porcentagem do peso do material hidratado obtido pelo peso da solução inicial utilizada para a reação % (P/V), antes dos processos de secagem.

^b Representa a porcentagem do peso do hidrogel seco obtido pelo peso inicial dos polissacarídeos utilizados na solução de reação % (P/P).

O rendimento da formação dos hidrogéis conforme as diferentes proporções de heteroramnana e quitosana testadas foram avaliadas a partir da comparação entre o peso do sobrenadante e precipitado (antes do processo de secagem), com o peso da solução utilizada para a reação, assim como, o peso do hidrogel seco com o peso inicial dos polissacarídeos utilizados na reação. No rendimento avaliando a formação dos hidrogéis hidratados, observa-se uma perda média de material (5%), que pode estar relacionado a evaporação de água e ácido acético durante as 4 h de agitação do processo. Verifica-se que as proporções 2:1, 3:2, 3:4 e 5:2 foram os que apresentaram os melhores rendimentos de formação de hidrogéis (37-70%). Enquanto que as proporções restantes (1:1, 1:2; 1:3, 1:4, 1:5, 2:3, 2:5, 3:1, 3:5, 4:1, 4:3, 4:5, 5:1, 5:2, 5:3 e 5:4), demonstraram baixa formação do mesmo (4-20%) e alta concentração de sobrenadante remanescente (80-90%).

Após o processo de secagem do hidrogel, observa-se que o rendimento das proporções 2:1, 3:2, 4:3 e 5:3 foram as que apresentaram a melhor interação entre os polissacarídeos, tendo 79-89% do peso inicial utilizados na reação, presentes na composição final dos hidrogéis formados. As proporções 1:4 e 1:5 foram as que demonstraram menor rendimento da formação de hidrogéis (13-18%). A partir destes resultados, observa-se que quando a proporção entre um polissacarídeo é 3 x superior em relação ao outro, a interação entre eles é baixa, resultando em um baixo rendimento na formação dos hidrogéis HQ. Verifica-se que a formação de hidrogéis ocorre preferencialmente quando há uma concentração de 1 x superior de heteroramnana em relação a quitosana. Em vista disso, observa-se a importância da heteroramnana na formação dos hidrogéis em estudo.

4.2.2 Caracterização Físico-Química dos Hidrogéis HQ

Foram realizadas as análises de Termogravimetria (TGA) para verificar a resistência termal dos hidrogéis HQ. Outra análise realizada foi para verificar a capacidade de absorção de fluídos destes materiais. As amostras selecionadas para as seguintes análises foram 1:1, 1:4, 1:5, 2:1, 3:2, 4:1, 4:3, 5:1, 5:3 e 5:4.

4.2.2.1 Capacidade de Absorção de Flúidos

A capacidade de absorção de flúidos dos hidrogéis formados foi verificada quando reidratadas em água destilada e tampão fosfato (20 mMol/L e pH 7,0) nos períodos de 30 min, 0,5, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 e 48 h. A partir das análises, observa-se que os hidrogéis testados apresentam uma alta capacidade de absorção, podendo reter flúidos em sua estrutura de 7 a 10 vezes em relação a sua massa inicial (Gráfico 1).

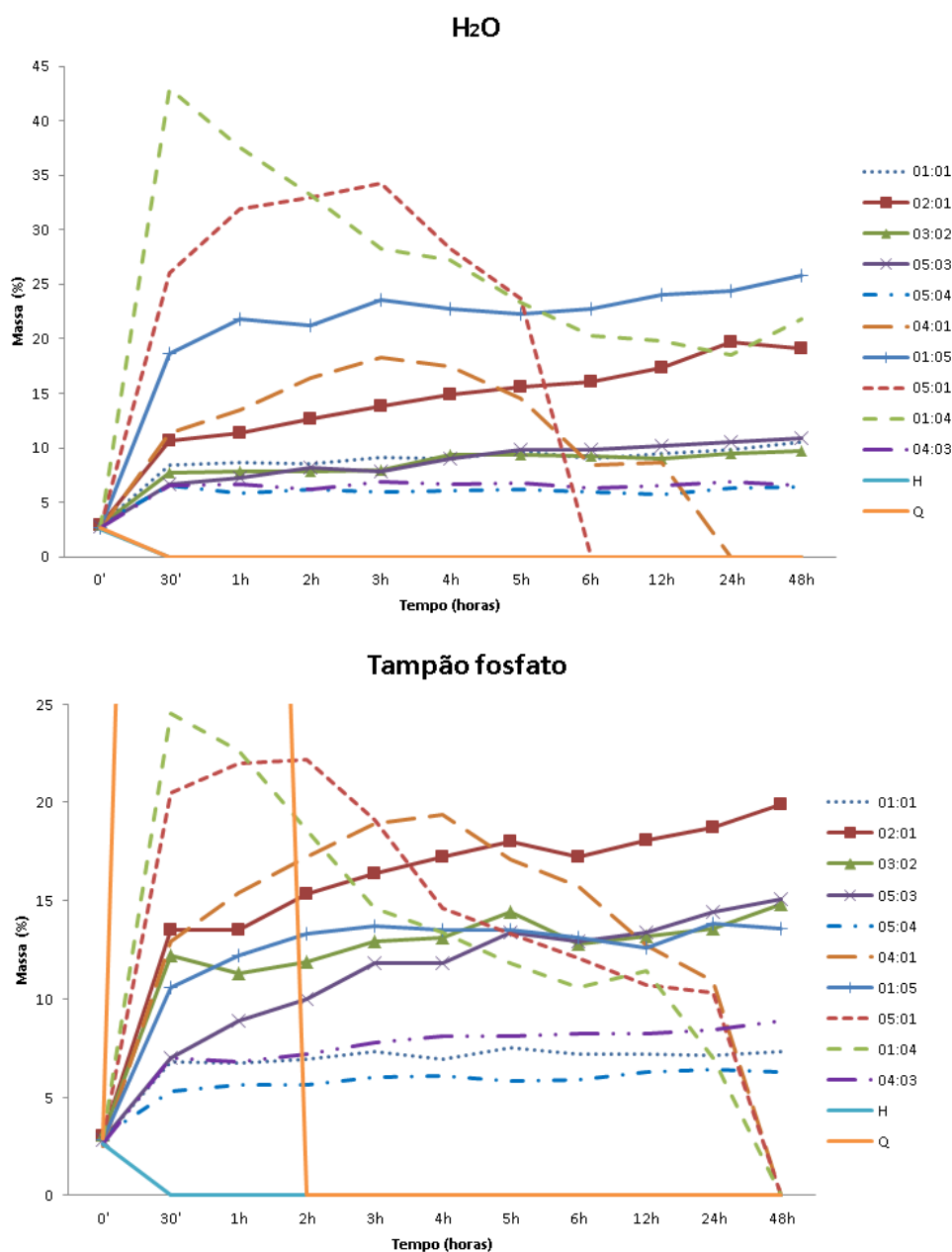
A quantidade de água absorvida em um hidrogel esta relacionada com a presença de grupos específicos, como $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{CONH}-$ e $-\text{SO}_3\text{H}$, do mesmo modo que o efeito da capilaridade e a pressão osmótica influenciam o equilíbrio da água absorvida pelo hidrogel (DERGUNOV; MUN, 2009). Durante a análise, observa-se que os filmes formados pelos polissacarídeos heteroramnana e quitosana isoladamente, não apresentam a capacidade de manter-se na forma de hidrogéis, visto que não houve interação química entre os grupos funcionais, estando disponíveis para interagirem com a água, e deste modo, ocorrendo a re-hidratação e solubilização total no solvente no período máximo de 2 h.

Também verificou-se a ocorrência da solubilização total no meio flúido das amostras 1:4, 5:1 e 4:1, após um período de no mínimo 6 h de reidratação. Observa-se que em água destilada a capacidade de absorção de flúidos de hidrogéis chega a ser próximo do dobro quando comparado com a reidratação com o tampão fosfato. Nas amostras que solubilizam durante a reidratação, o fenômeno de solubilização acontece mais rapidamente em água. Resultados similares foram obtidos por Tabata e Ikada (1998) em hidrogéis formados a partir de gelatina, observando que a degradação dos hidrogéis é proporcional a quantidade de água absorvida, e, deste modo, quanto maior for a quantidade de água absorvida, mais rápida é a solubilização do biomaterial.

Este fato poderia ser explicado devido a capacidade quelante do tampão fosfato. A presença de íons, como o sódio, propicia um ambiente favorável para que as ligações de *crosslinking* entre os polissacarídeos se mantenham mais estáveis. Neste sentido, a absorção de flúidos é menor quando em tampão fosfato, visto que a estrutura tridimensional é mantida e somente o volume existente pela estrutura é absorvido pelos hidrogéis. Já as amostras que são reidratadas com água, e não apresentam uma interação forte de *crosslinking* entre os polissacarídeos, acabam

tendo um valor de absorção muito elevado, devido as ligações iônicas que são rompidas, liberando mais espaços para a entrada de água e a interação por ligações de hidrogênio, resultando na solubilização dos polímeros. Nos estudos realizados por Nair e colaboradores (2007), demonstrou-se a capacidade quelante de fosfato de amônio a partir de uma pequena concentração (15 mg/mL) para a formação e conservação de hidrogéis de quitosana.

GRÁFICO 1. CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE FLUÍDOS DOS HIDROGÉIS HQ QUANDO REIDRATADOS EM ÁGUA DESTILADA E TAMPÃO FOSFATO



Hidrogéis HQ 1:1, 1:4, 1:5, 2:1, 3:2, 4:1, 4:3, 5:1, 5:3, 5:4, Heteroramnana (H) e Quitosana (Q) mantidos em água destilada e tampão fosfato, durante os períodos de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 e 48 h.

Assim como as ulvanas, as heteroramnanas apresentam uma estrutura que contém grupamentos hidroxila, carboxila e sulfatos, que permitem a ligação com moléculas de água através de ligações de hidrogênio, caracterizando o polímero como um polissacarídeo hidrofílico. Estas características podem influenciar diretamente na natureza do hidrogel desenvolvido. Em estudos com hidrogéis desenvolvidos a partir de ulvanas, observaram-se resultados similares de hidrogéis com alta capacidade de absorção de fluídos (MORELLI; CHIELLINI, 2010; ALVES et al., 2012).

Nas amostras 1:1, 1:5, 3:2, 4:3 e 5:3 foi possível observar uma absorção inicial alta nos primeiros 30 min de reidratação, e durante as 48 h seguidas, manteve-se com volume constante. Já as amostras 2:1 e 5:4 demonstraram absorver continuamente durante o período analisado. A complexação polieletrólítica ocorre conforme a disponibilidade de cargas opostas. Visto que diferentes proporções de polissacarídeos foram testadas, e a interação entre os grupamentos com cargas pode se dar de forma aleatória, não se descarta a possibilidade de ocorrer a formação de hidrogéis com baixa interação polieletrólítica, fazendo com que uma parte dos grupamentos permaneçam livres para interações, e desta forma, sendo facilitada por ligações de hidrogênio entre a água. Esta capacidade absorptiva também pode estar relacionada com a estrutura tridimensional formada, visto que, algumas amostras apresentaram estruturas mais porosas que outras, facilitando a difusão do fluído entre a matriz, como será demonstrado posteriormente por análises de MEV (Seção 4.2.5, pág. 130).

4.2.2.2 Análises Termogravimétricas (TGA)

As propriedades termais dos hidrogéis HQ foram analisadas por Termogravimetria (TGA). Esta análise permite quantificar as mudanças de massa do material conforme o tempo e a temperatura aplicada, tendo em vista determinar a estabilidade da amostra. Na Figura 24 é possível observar os gráficos de TGA gerados a partir das análises, sendo observado um padrão similar da perda de massa conforme o aumento da temperatura para os hidrogéis HQ, evidenciado por duas fases de transição destes materiais. Observa-se que os hidrogéis HQ apresentam comportamento semelhante ao polissacarídeo heteroramnana, porém as fases de transição deste polissacarídeo ocorrem em menor temperatura. Em

contrapartida, verifica-se que a quitosana apresenta três fases de transição bem distintas durante o aumento da temperatura.

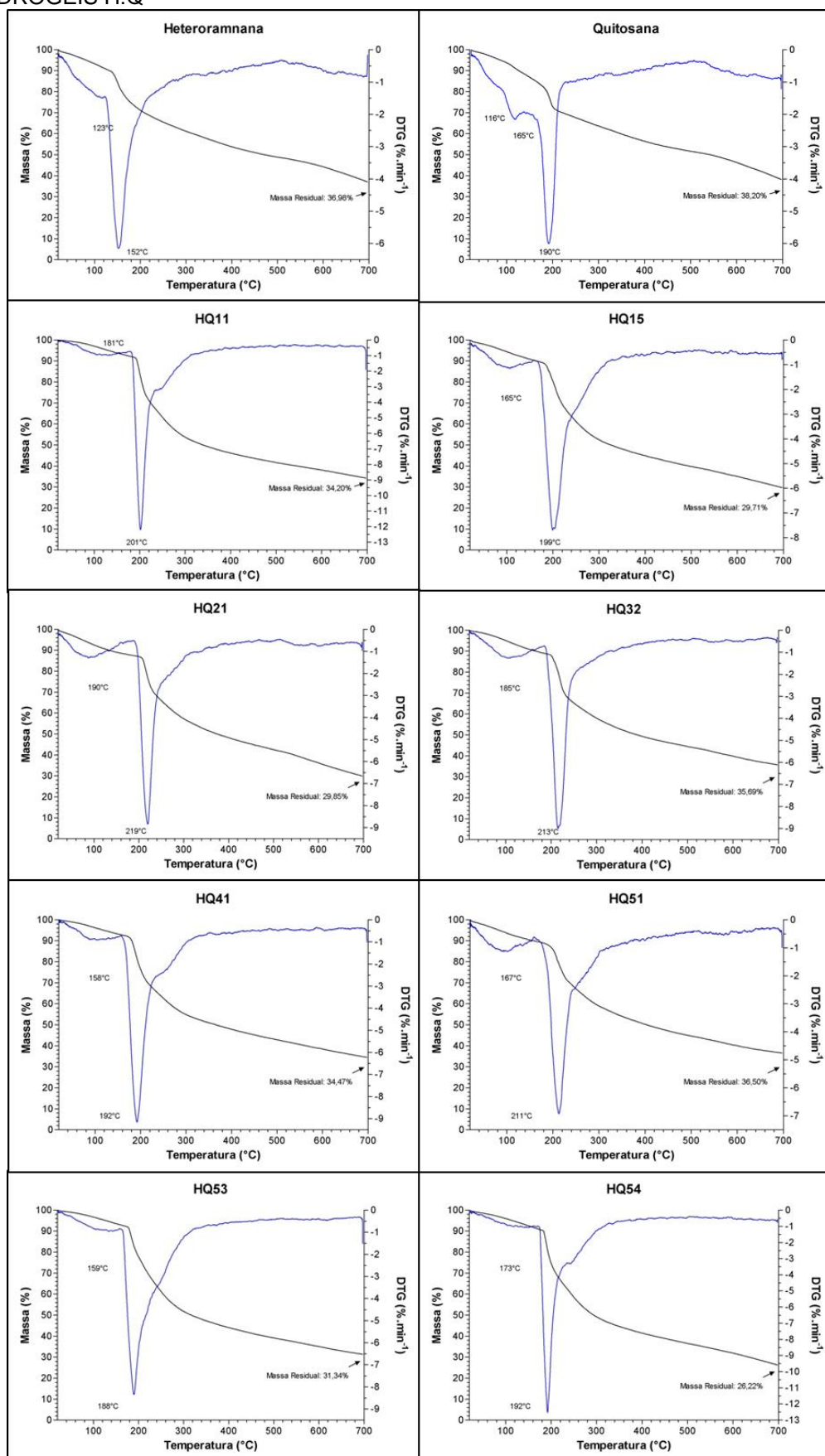
Na curva termogravimétrica da quitosana, o primeiro pico endotérmico é observado na faixa de temperatura entre 20°C a 120°C, com um pico mínimo em 89°C. Nesta fase houve perda de massa de aproximadamente 9%, sendo atribuída a perda de água por evaporação adsorvida no polissacarídeo. Na segunda fase de transição, entre 165°C a 220°C, observa-se o pico em 190°C. Nesta fase, houve perda de massa de aproximadamente 18%, e pode ser relacionado a degradação da cadeia polimérica com a vaporização de compostos voláteis, como o ácido acético. A terceira fase de transição pode ser observada entre a faixa de temperatura de 225°C a 700°C, e corresponde a degradação de ligações cruzadas residuais da quitosana, tendo nesta fase uma perda de massa de aproximadamente 32%. Estes resultados estão de acordo com a literatura (NIETO et al., 1991; LOPEZ et al., 2008; CORAZZARI et al., 2015).

A curva termogravimétrica da heteroramnana apresentou três fases de transição, sendo o primeiro pico endotérmico observado na faixa de temperatura entre 20°C a 125°C. Nesta fase houve perda de massa de aproximadamente 9%, sendo atribuída a perda de água por evaporação adsorvida no polissacarídeo. Na segunda e terceira fase de transição, entre 125°C a 700°C, não é possível distinguir com precisão a passagem entre uma e outra, sugerindo-se a transição em aproximadamente 277°C. Na segunda fase, observa-se em evidência o pico em 190°C, e verifica-se a perda de massa de aproximadamente 30%, sendo relacionado a degradação da cadeia polimérica da heteroramnana. A terceira fase de transição pode ser observada entre a faixa de temperatura de 280°C a 700°C, e corresponde a degradação de ligações cruzadas residuais da heteroramnana, tendo nesta fase uma perda de massa de aproximadamente 24%.

Em análises termogravimétricas com ulvanas, observou-se comportamento semelhante ao das heteroramnanas, sendo demonstrada estabilidade térmica do polissacarídeo até temperaturas próximas a 200°C (ALVES et al, 2010). A pirólise da estrutura de polissacarídeos inicia a partir de quebra aleatória das ligações glicosídicas, seguido de decomposições formando ácido acético e butírico e outros ácido graxos de baixo peso molecular, com predominância em C2, C3 e C6 (NIETO et al., 1991).

Nos hidrogéis HQ, observa-se uma primeira fase de transição que varia na faixa de temperatura entre 20°C a 160°C, sendo atribuída a perda de água adsorvida nos hidrogéis por evaporação. O aumento da temperatura atribuída a esta primeira fase da perda de água, de 120 °C nos polissacarídeos isolados para 160 °C nos hidrogéis poderia indicar uma maior capacidade de retenção do solvente nas estruturas tridimensionais dos géis em relação aos polissacarídeos isolados. Uma segunda fase de transição é observada com maior evidência, entre 160°C a 220°C, e pode ser relacionado à degradação da cadeia polimérica com a vaporização de compostos voláteis, como o ácido acético. A terceira fase de transição, em maior evidência nas amostras 1:1 e 5:4, observada na faixa de temperatura entre 220°C a 700°C pode ser atribuída a degradação de ligações cruzadas restantes entre a quitosana e a heteroramnana. A partir deste resultado, sugere-se que a presença da quitosana nos hidrogéis HQ promove um material mais resistente a degradação térmica, assim como, as amostras 2:1, 3:2 e 5:4 que demonstraram capacidade de absorção de fluídos constante (pág. 110), também demonstraram ser mais resistentes à temperatura, sugerindo de que essas estruturas apresentam uma interação eletrostática mais estável.

FIGURA 24. TERMOGRAVIMETRIA DOS POLISSACARÍDEOS HETERORAMNANA, QUITOSANA E DOS HIDROGÊIS H:Q



4.2.3 Caracterização Química dos Hidrogéis HQ

Para a caracterização química dos hidrogéis HQ foram realizadas análises de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Espectroscopia Raman. As amostras selecionadas para as análises foram os hidrogéis de proporção Heteroramnana:Quitosana 1:1, 1:4, 1:5, 2:1, 3:2, 4:1, 4:3, 5:1, 5:3 e 5:4.

4.2.3.1 Caracterização por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

As análises de EDS foram realizadas nos hidrogéis secos à vácuo. A composição elementar das amostras (Tabela 7) é constituída majoritariamente pelos elementos carbono (41-52%), oxigênio (10-36%) e nitrogênio (1-6%). Esses valores estão de acordo com o esperado, visto que os hidrogéis foram desenvolvidos a partir de moléculas orgânicas como os polissacarídeos.

TABELA 7. COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DETERMINADA POR EDS DOS HIDROGÉIS FORMADOS DE HETERORAMNANA:QUITOSANA (HQ)

Amostras H:Q	Composição Elementar						
	B	C	N	O	Na	Al	S
1:1	4,0	51,4	5,3	35,2	---	---	4,2
1:4	4,7	50,5	4,4	35,8	0,4	0,1	4,0
1:5	45,2	42,0	1,5	10,2	0,1	---	1,0
2:1	5,0	50,9	4,6	33,4	0,3	1,8	4,0
3:2	4,5	52,0	5,3	33,0	0,2	0,7	4,3
4:1	5,3	51,6	4,6	31,8	0,6	1,3	4,9
4:3	4,7	51,0	4,4	34,1	5,0	1,0	4,4
5:1	4,8	50,8	4,7	33,9	0,5	0,3	5,1
5:3	45,7	41,1	1,7	10,4	0,1	---	1,1
5:4	5,2	51,7	4,6	32,4	0,4	1,0	4,8

Elementos analisados: Boro (B), Carbono (C), Nitrogênio (N), Oxigênio (O), Sódio (Na), Alumínio (Al) e Enxofre (S). --- Não detectado.

A presença das heteroramnana e quitosana nos hidrogéis justifica a detecção dos elementos enxofre (1-5%) e nitrogênio (1-5%), respectivamente. O enxofre, como descrito anteriormente, está presente na forma de grupamentos sulfatos (OSO_3^-) ligados à heteroramnana, confirmado a partir da dosagem de

sulfato (pág. 77) e análises de RMN (pág. 81) realizadas nos extratos de *G. brasiliensis*. Já o elemento nitrogênio pode ser encontrado, na forma de grupos aminos na quitosana (pág. 84, 89).

A partir das análises observa-se que os elementos enxofre e nitrogênio apresentam concentrações proporcionais similares nas amostras, aproximadamente 1:1 de N:S. Estes dados sugerem que para a formação dos hidrogéis ser viável, é necessária esta proporção mínima entre os polissacarídeos heteroramnana e quitosana. No entanto, mais análises devem ser realizadas para confirmar tal hipótese.

Na análise de EDS também foi detectado o elemento boro em concentrações similares ao nitrogênio e enxofre (4-5%, excetuando os hidrogéis 1:5 e 5:3). Para o desenvolvimento dos hidrogéis, os polissacarídeos foram solubilizados em soluções contendo 20 mMol de ácido bórico e 1 M de ácido acético. O ácido bórico é considerado ácido de Lewis, e a sua dissociação ocorre através da ligação com uma molécula de água. Com a dissociação deste ácido, verifica-se a formação do ânion tetrahidroxiborato ($B(OH)_4^-$) que pode se complexar a outra molécula carregada positivamente (ANDONOVA, 1991). Nos hidrogéis HQ, presume-se que o borato colabora na interação entre os polissacarídeos heteroramnana e quitosana, fazendo parte da constituição do material formado. As possíveis interações entre os polissacarídeos e o borato, serão descritas mais adiante.

Nas amostras 1:5 e 5:3, observou-se uma alta concentração de boro (45%). Este resultado pode ter sido influenciado pela heterogeneidade da amostra. A análise de EDS é realizada através da interação do feixe de elétrons que incide sobre uma microárea (0,1-1 μm) da amostra, provocando a excitação dos elétrons dos elementos presentes e provocando a emissão de fótons de raio-x característicos que serão captados pelo detector (FITZGERALD, 1968). Fatores como a concentração, volume e homogeneidade da amostra podem interferir nas análises (LAWRENCE et al., 1999). Os hidrogéis que apresentaram os níveis elevados do elemento boro (HQ 1:5 e 5:3) não foram utilizados nos testes biológicos com células e foram armazenados para futuros estudos, podendo ser submetidos a novas análises de EDS.

Nas análises de EDS dos hidrogéis foram observadas baixas concentrações de sódio (0,1-0,6%, excetuando os hidrogel 4:3 com 5%) e alumínio (0,1-1,8%). O sódio pode estar presente nas amostras como contra-íon dos grupos sulfatos, sendo

esperado em uma percentagem equivalente ao enxofre. As baixas concentrações de Na podem indicar que os grupos sulfato apresentam, além de Na, outros contra-íons presentes. As algas marinhas podem apresentar em sua composição valores de cinzas variando de 8 a 40% do seu peso seco, e conter diversos minerais como magnésio, sódio e cálcio entre outros (YAMAMOTO, 1980; ITO; HORI, 1989). Desta forma, a presença de outros elementos químicos nos hidrogéis contendo polissacarídeo de algas, também é esperada.

A Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) permitiu verificar a constituição química dos hidrogéis HQ e confirmar a presença dos principais elementos químicos utilizados no desenvolvimento do biomaterial.

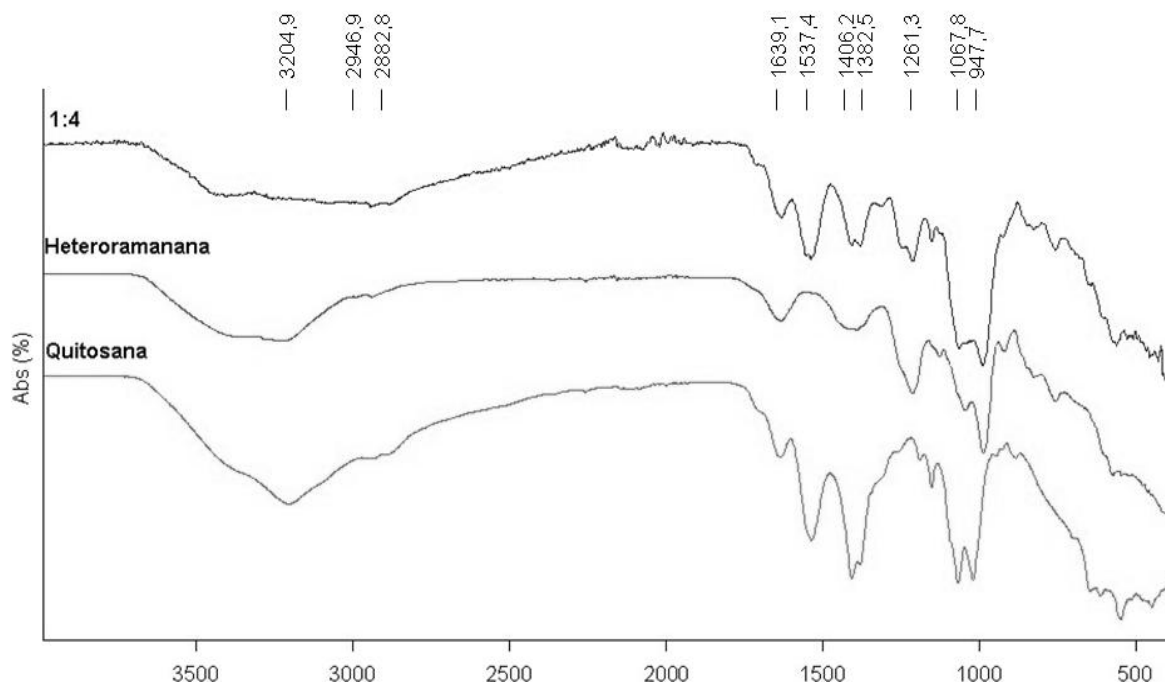
4.2.3.2 Caracterização por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização química dos hidrogéis HQ foram realizados através de análises de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e comparadas com os sinais característicos observados nos espectros dos polissacarídeos heteroramnana e quitosana. A partir dos hidrogéis formados com diferentes proporções destes polissacarídeos, foi possível observar que os espectros de FTIR são muito semelhantes entre si, havendo diferenças na intensidade de absorção de alguns sinais específicos (Figura 26).

A partir dos sinais de absorção característicos da heteroramnana e da quitosana (Tabela 5, pág. 92), observa-se que estes estão presentes nos hidrogéis HQ (Figura 25). Nos espectros nota-se a predominância de sinais de absorção característicos da quitosana, visto que este polissacarídeo apresentou um espectro complexo formado por mais bandas de absorção e mais intensos em comparação ao da heteroramnana. A presença da banda na região de 1500 cm^{-1} (vibrações de -NH de amina primária de 2-aminoglicose não acetilado ou -NH do grupo amida II) e $1639,1\text{ cm}^{-1}$ (vibrações da carbonila C=O do grupamento amida) pode ser considerado uma banda característica da quitosana, demonstrando a presença deste polissacarídeo na composição dos hidrogéis. O espectro formado pela heteroramnana também apresentou regiões complexas de absorção, não se descartando a possibilidade dos sinais estarem sobrepostos aos da quitosana. Verifica-se a presença da banda na região de 1220 e $759,3\text{ cm}^{-1}$ (vibrações de C-O-S) que podem ser consideradas bandas características da heteroramnana,

demonstrando a presença deste polissacarídeo na composição dos hidrogéis.

FIGURA 25. COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE FTIR DO HIDROGEL HQ 1:4 E DOS POLISSACARÍDEOS HETERORAMANA E QUITOSANA



A região de 3500 a 3000 cm^{-1} foi relacionado as vibrações dos grupos funcionais $-\text{OH}$, $-\text{NH}$ e $-\text{COOH}$, e observa-se uma diminuição na absorção das bandas nesta região, demonstrando a presença em baixas concentrações destes grupos funcionais nos hidrogéis formados. Em contrapartida, as bandas em 1050 e 950 cm^{-1} verifica-se um aumento significativo, vibrações estas, relacionadas as ligações $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ de ligações glicosídicas e $\text{B}-\text{OH}$ ou $\text{B}-\text{O}$ do ácido bórico, respectivamente.

O ácido bórico possui características que permitem a sua conversão a ânions tetrahidroxiborato e a formação de complexos com dióis. Esta interação pode ocorrer de forma espontânea e reversível em solução aquosa, conforme condições específicas de pH e concentração (HENDERSON et al., 1973). Estudos de RMN de ^{13}C e ^{11}B , confirmaram a capacidade do ácido bórico em formar complexos com o polissacarídeo ulvana quando em pH 7,5, sendo observada esta interação a partir das hidroxilas presentes no anel da ramnose, ácido glucurônico e idurônico (LAHAYE et al., 1998). Os polissacarídeos quitosana e heteroramnana, possuem em suas estruturas alta concentração de hidroxilas livres, além dos grupamentos

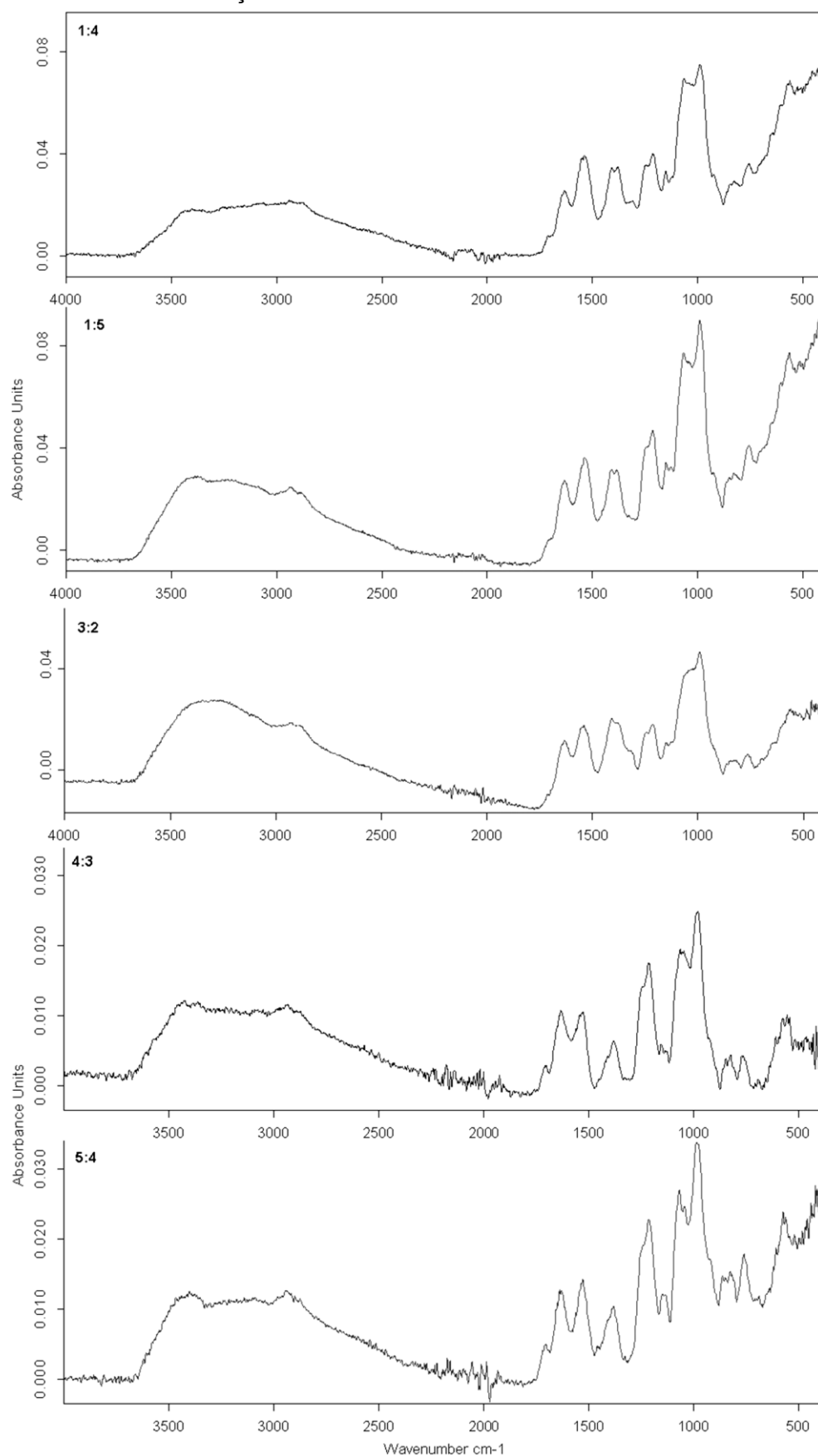
carboxila, sulfato e amino, demonstrando ter condições favoráveis para a interação com o ânion borato.

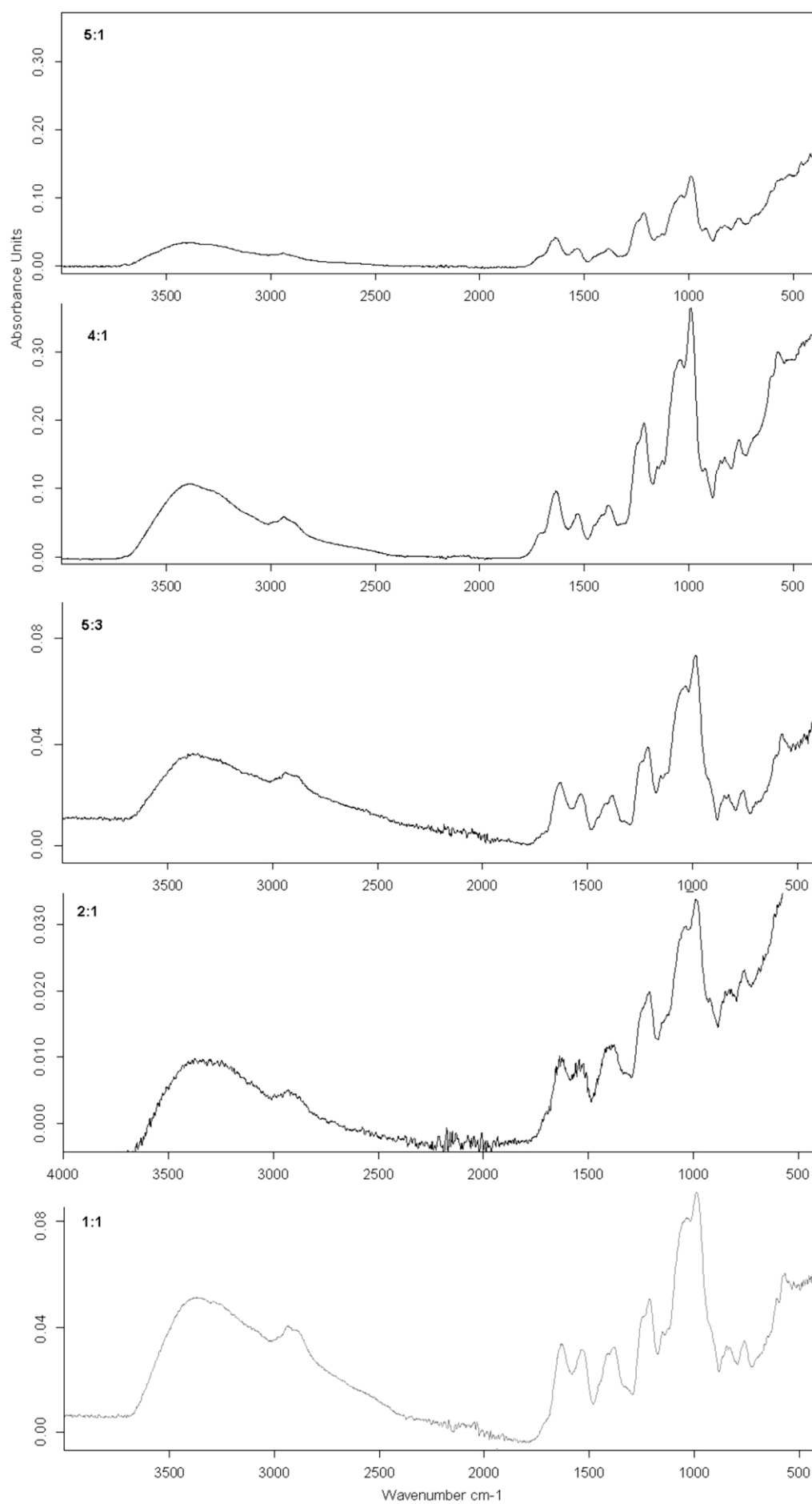
Nos estudos realizados por Toskas e colaboradores (2011), observou-se a formação de hidrogéis com estruturas fibrosas a partir da complexação entre os polissacarídeos de *Ulva rigida* (ulvana) com polivinil álcool (PVA). Neste estudo foram testados diferentes tipos de solventes com baixa constante dielétrica, e verificou-se que o solvente contendo ácido bórico e cálcio foi o que melhor permitiu a formação das estruturas, através de ligações éster formados pela intercalação entre o boro e as hidroxilas livres, e intermediados pelo cálcio. Em outro estudo desenvolvido pelo mesmo grupo, demonstrou-se a mesma eficácia do ácido bórico e cálcio para o desenvolvimento de hidrogéis a partir de ulvanas com a quitosana (TOSKAS et al., 2012).

O mecanismo para a formação de géis a partir da ulvana ainda não é bem esclarecido, no entanto, se sabe da necessidade da presença de cátions divalentes para que ocorra o processo de geleificação (LAHAYE; ROBIC, 2007). Nos hidrogéis formados a partir da heteroramnana com a quitosana, observa-se que a presença, somente do ácido bórico, foi o suficiente para a formação dos complexos polieletrólitos. Visto que as heteroramnanas apresentam uma estrutura química bastante complexa em relação as ulvanas, sugere-se que a presença em maior concentração dos grupos funcionais, tornam a formação de ligações de hidrogênio inter e intramolecular mais acessíveis.

A partir das diferentes proporções testadas de heteroramnana e quitosana, observa-se que os hidrogéis formados apresentam um padrão de similaridade na estrutura química, observando-se variações de intensidade de interação entre os grupos funcionais presentes. Visto que a formação dos hidrogéis ocorre através da interação aleatória entre os grupamentos presentes em cada polissacarídeo, é de se esperar que haja diferenças nas intensidades de absorção de diferentes vibrações. Na Figura 26, é possível observar um padrão de similaridade entre os espectros dos hidrogéis 1:4, 1:5 e 3:2; entre 4:3 e 5:4; entre 4:1, 5:1 e 5:3, assim como entre 1:1 e 2:1.

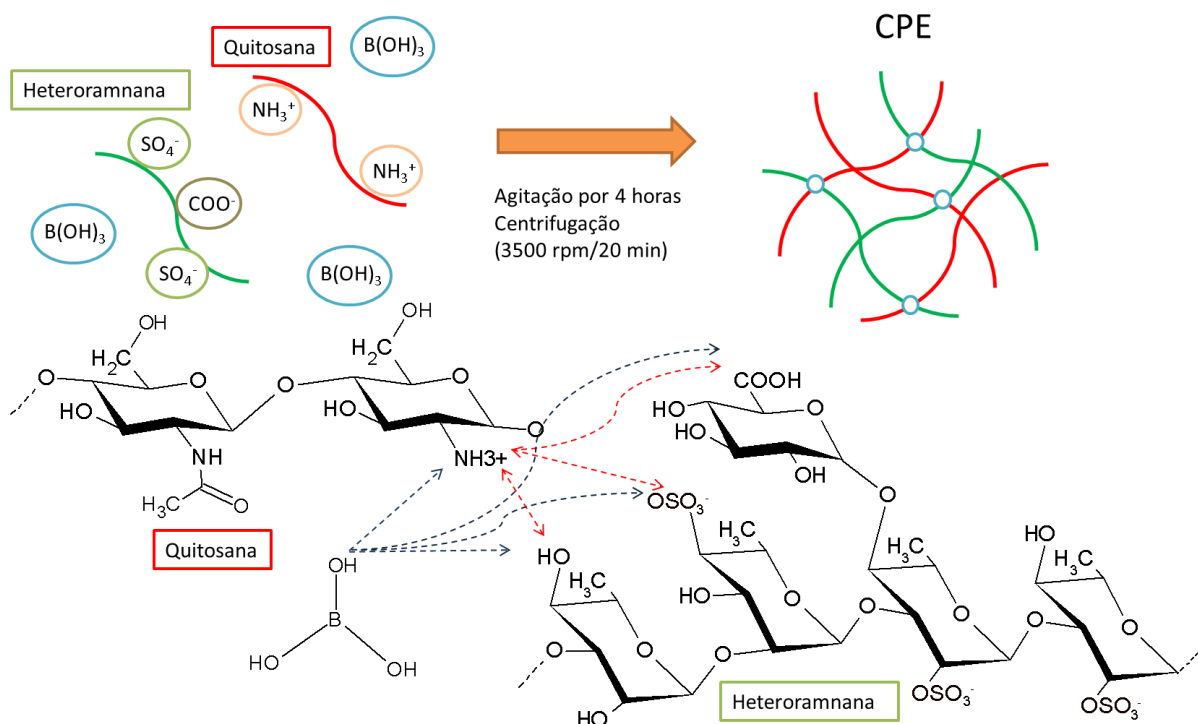
FIGURA 26. ESPECTROS DE FTIR GERADOS A PARTIR DOS HIDROGÉIS HQ FORMADOS POR DIFERENTES PROPORÇÕES DE HETERORAMNANA E QUITOSANA





A partir dos espectros gerados, sugere-se possíveis interações entre os polissacarídeos heteroramnana, quitosana e o ácido bórico para a formação dos complexos polieletrólitos na forma de hidrogel. Essas interações podem ocorrer a partir de ligações covalentes ou iônicas entre os grupos hidroxilas do anel, os grupos carboxilas do ácido urônico e as aminas livres com o ânion borato, assim como, por ligações de hidrogênio envolvendo moléculas de água ou ácido bórico. Estas possíveis interações para a formação dos complexos polieletrólitos estão ilustradas na figura a seguir (Figura 27).

FIGURA 27. ESQUEMATIZAÇÃO ILUSTRANDO AS POSSÍVEIS INTERAÇÕES QUÍMICAS ENTRE OS GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NA HETERORAMNANA E QUITOSANA E ÁCIDO BÓRICO PARA A FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS POLIELETRÓLITOS



FONTE: Autor (2017).

4.2.3.3 Caracterização por Raman

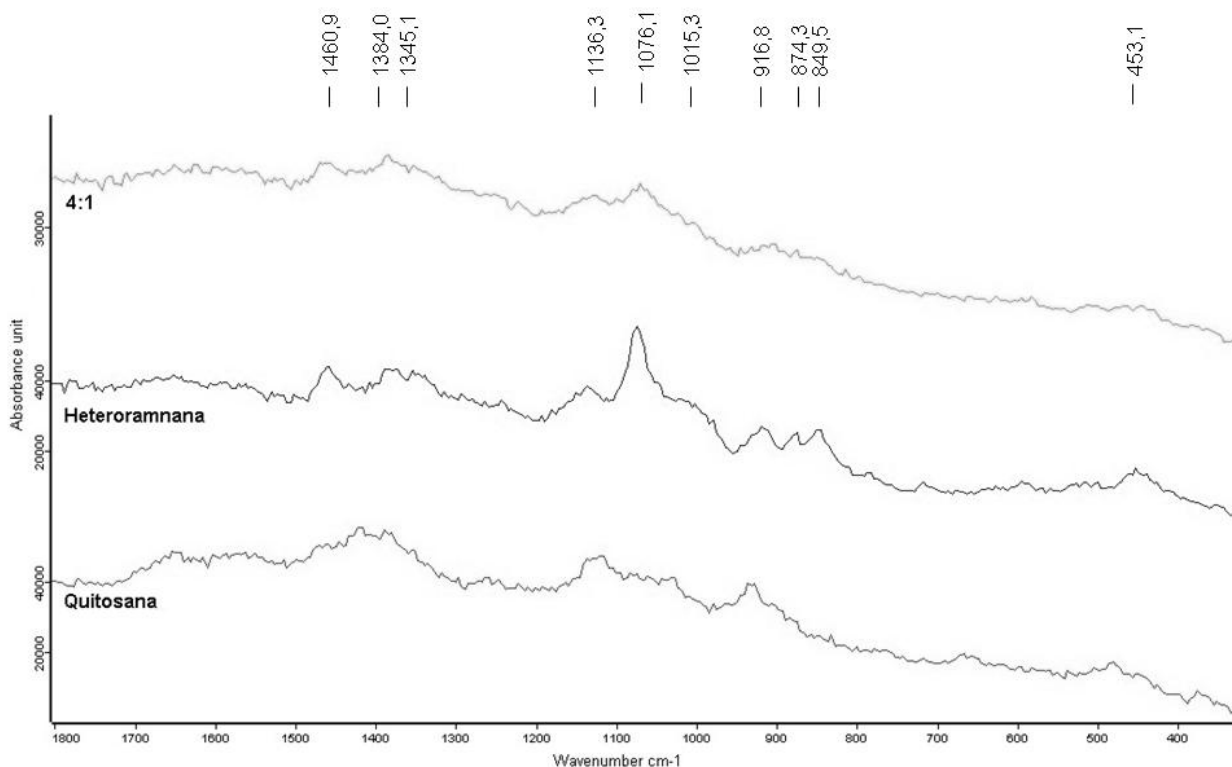
As análises dos hidrogéis HQ por espectroscopia Raman foram comparadas com os sinais característicos observados nos espectros dos polissacarídeos heteroramnana e quitosana. A partir dos hidrogéis formados com diferentes proporções destes polissacarídeos, observa-se que os espectros de Raman são muito semelhantes entre si, sendo possível correlacionar a absorção de alguns

sinais específicos da heteroramnana e da quitosana, observando-se diferenças na intensidade de absorção desses sinais (resultados não demonstrado).

No hidrogel 4:1 observa-se o sinal mais evidente em $1076,1 \text{ cm}^{-1}$, que foi atribuído a vibrações das ligações glicosídicas, em evidência no espectro da heteroramnana. Sinais característicos do polissacarídeo heteroramnana podem ser visto de forma sucinta em $1384,0 \text{ cm}^{-1}$ atribuída a vibrações assimétricas do grupamento SO_2 , enquanto que na região de absorção entre 1500 a 1400 cm^{-1} as bandas observadas poderiam ser relacionadas a vibrações das ligações C–N de aminas primárias.

Os espectros gerados por Raman apresentaram muito ruído de fundo, com baixa relação sinal/ruído, dificultando as análises e a identificação dos sinais específicos. Como descrito anteriormente, sugere-se que a autofluorescência emitida pelos hidrogéis interferem nas análises por Raman, e deste modo, esta análise pode demonstrar, somente, a presença dos principais grupos funcionais presentes nos hidrogéis HQ. Por esta razão, apenas o espectro do hidrogel 4:1 foi apresentada (Figura 28), representando as análises dos outros hidrogéis HQ.

FIGURA 28. COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RAMAN DO HIDROGEL 4:1 E DOS POLISSACARÍDEOS HETERORAMANA E QUITOSANA



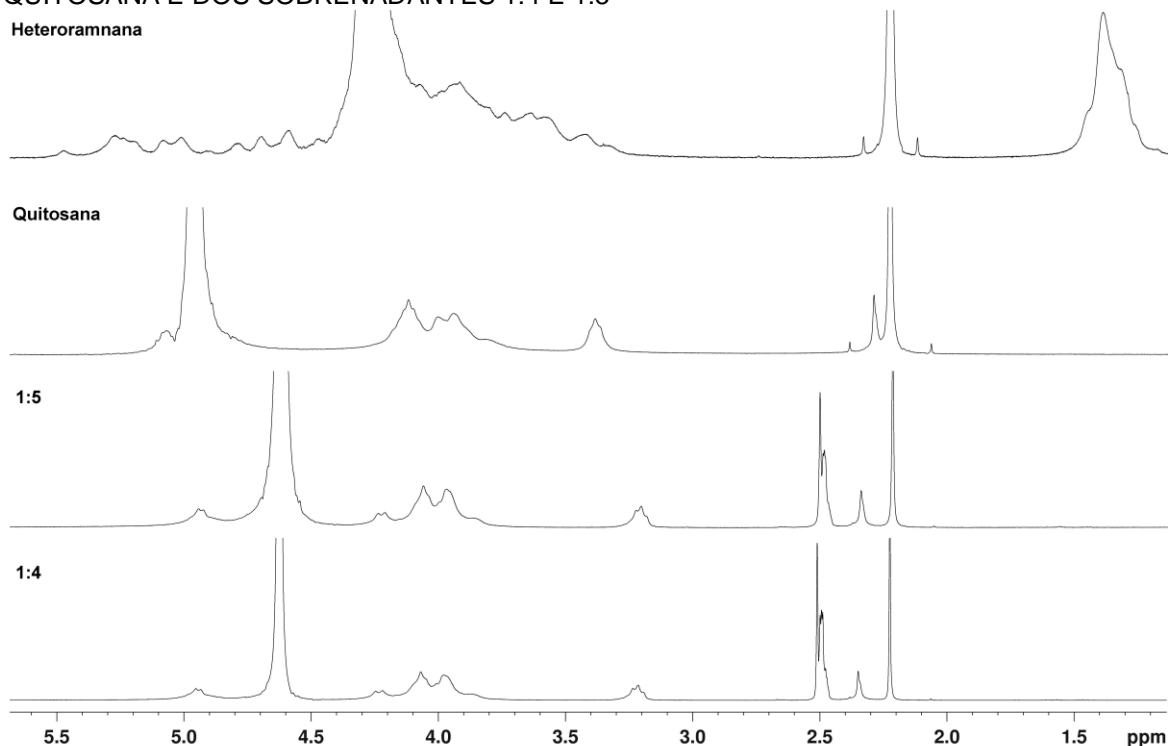
4.2.4 Análise dos Sobrenadantes

Os sobrenadantes obtidos a partir da reação de formação dos hidrogéis foram analisados por ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN de ^1H), e para verificar a homogeneidade foram analisadas por HPSEC-MALLS-RID.

4.2.4.1 Análise por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

Os sobrenadantes gerados a partir da formação dos hidrogéis foram analisados por RMN de ^1H . A partir dos espectros gerados, foi possível observar semelhanças na composição dos sobrenadantes conforme as diferentes proporções de heteroramnana e quitosana testadas. No espectro gerado a partir do sobrenadante dos hidrogéis 1:4 e 1:5, é possível observar sinais pouco intensos, e a predominância de sinais da quitosana com um leve deslocamento de 0,17 ppm (Figura 29). Este deslocamento apresentado, pode ser em decorrência de mudanças estruturais e/ou conformacionais dos polissacarídeos, que ocorrem em virtude de ligações formadas durante a reação de complexação polieletrólítica.

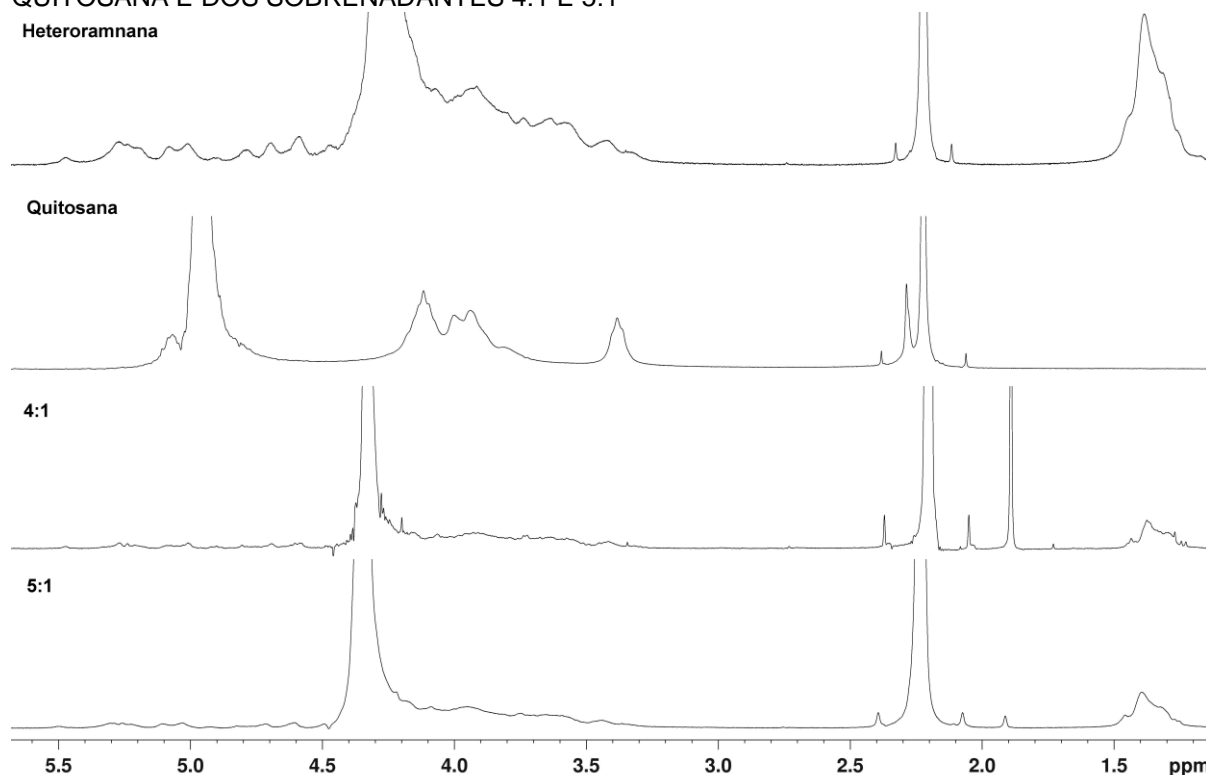
FIGURA 29. COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DE HETERORAMNANA, QUITOSANA E DOS SOBRENADANTES 1:4 E 1:5



Solvente: D_2O com ácido acético 1%. Temperatura: 30°C. Padrão Interno: Acetona (2,225 ppm).

Visto que a formação dos hidrogéis se dá pela interação polieletrólítica entre cargas opostas presentes nos polissacarídeos, quando ocorre a saturação de íons livres, torna-se inviável a formação de hidrogéis a partir de um polissacarídeo. Deste modo, é possível afirmar que a proporção 1 de heteroramnana utilizada para desenvolver os hidrogéis 1:4 e 1:5 foram integradas ao complexo polieletrólito formado, visto que os sinais da heteroramnana não foram observados no espectro de RMN do sobrenadante, enquanto que a proporção 4 e 5 de quitosana utilizada foi além do necessário para a formação do complexo, sendo observado a predominância dos sinais referentes a quitosana. Em contrapartida, os espectros gerados pelo sobrenadante dos hidrogéis 4:1 e 5:1 (Figura 30) apresentou sinais predominantes da heteroramnana. Desta forma, pode-se concluir que em proporções de concentrações superiores a 4 ou 5 vezes de heteroramnana ou quitosana, o polissacarídeo em maior concentração não interage por completo e permanece solúvel no sobrenadante.

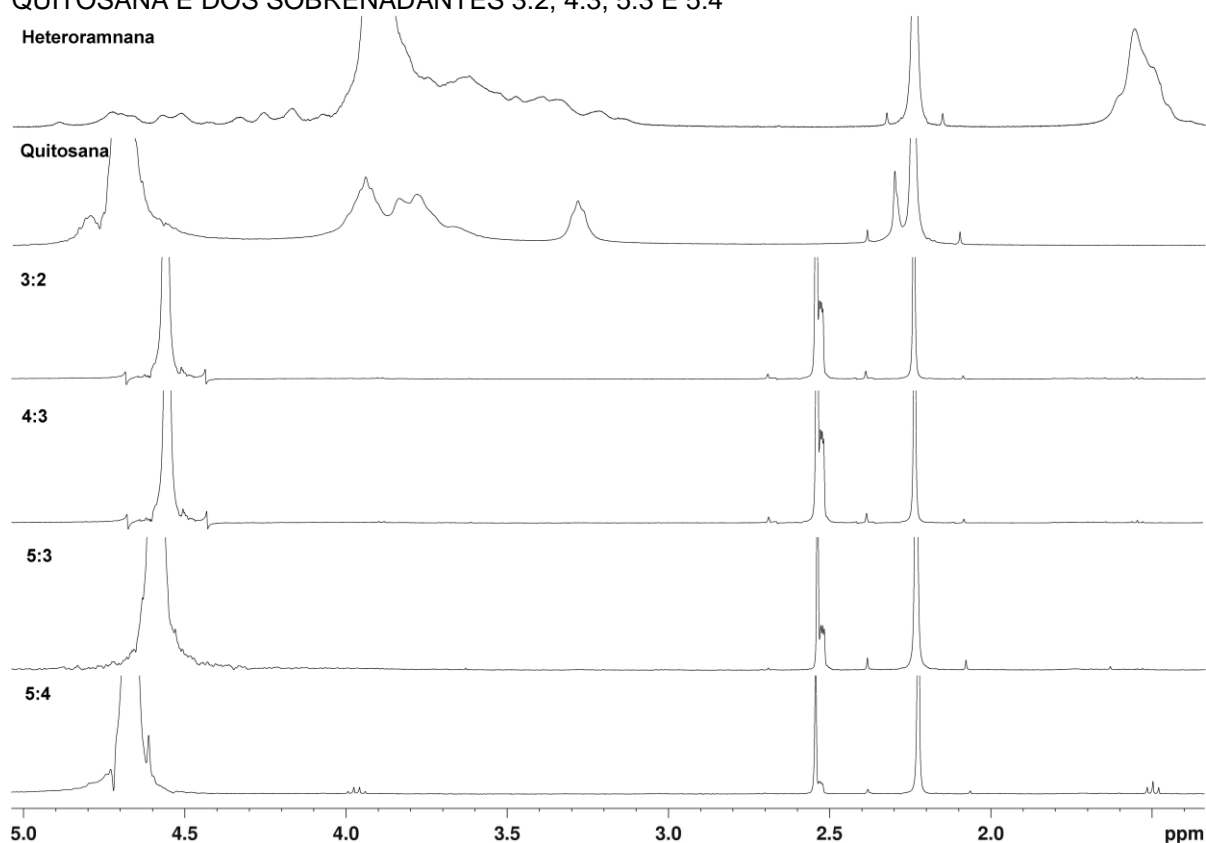
FIGURA 30. COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DE HETERORAMNANA, QUITOSANA E DOS SOBRENADANTES 4:1 E 5:1



Solvente: D_2O com ácido acético 1%. Temperatura: 30°C. Padrão Interno: Acetona (2,225 ppm).

Os hidrogéis HQ 3:2, 4:3, 5:3 e 5:4 apresentaram espectros semelhantes entre si, observando-se sinais de baixa intensidade referentes a quitosana ou heteroramnana (Figura 31). É possível verificar três bandas em 1,51/1,49/1,48 ppm que podem ser atribuídas ao H-6 do metil da ramnose, e quatro bandas na região de 3,99-3,94 ppm, que podem ser atribuídos ao H-5 da ramnose ou H-6 da quitosana.

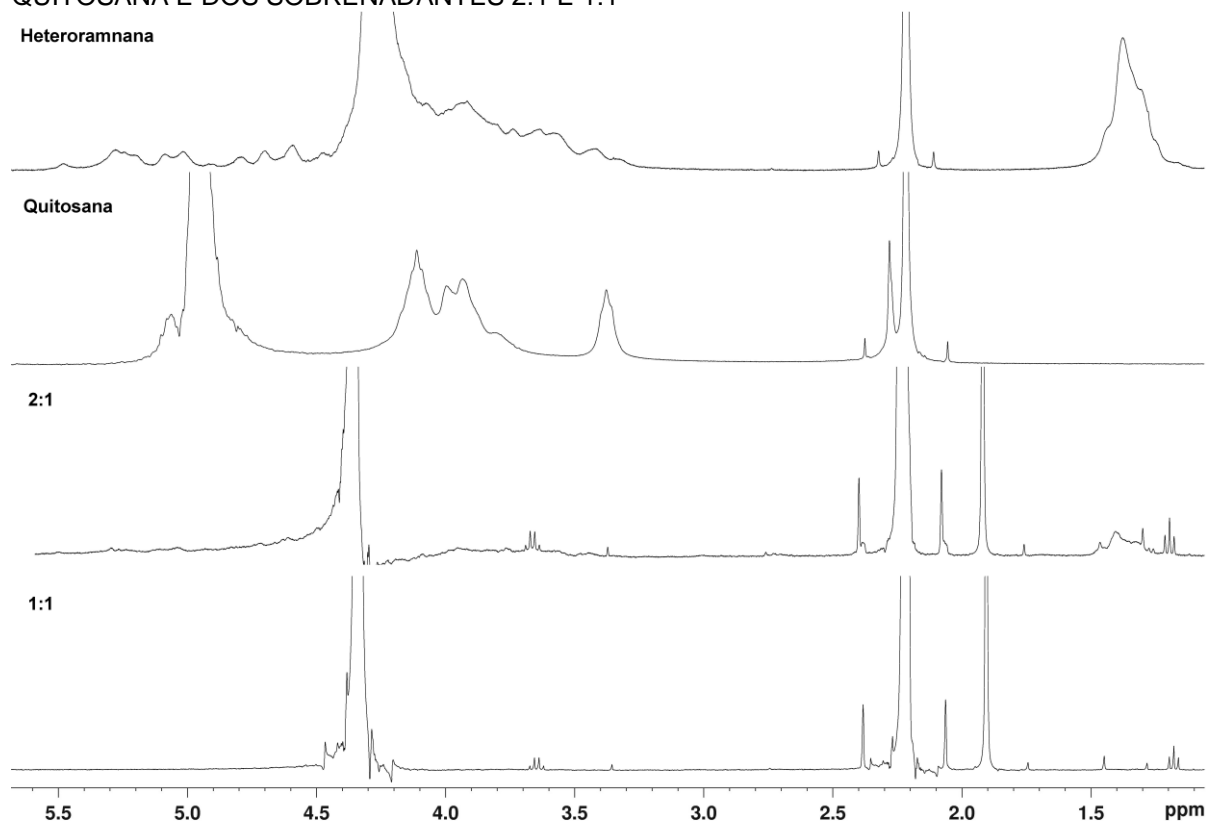
FIGURA 31. COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DE HETERORAMNANA, QUITOSANA E DOS SOBRENADANTES 3:2, 4:3, 5:3 E 5:4



Solvente: D_2O com ácido acético 1%. Temperatura: 30°C . Padrão Interno: Acetona (2,225 ppm).

O espectro gerado a partir dos sobrenadantes dos hidrogéis 1:1 e 2:1 apresentaram-se similares (Figura 32), sendo possível evidenciar alguns sinais da heteroramnana na região de 1,46-1,16 e 3,6 ppm. O sinal mais evidente foi observado em 1,90 ppm, o qual é atribuído ao ácido acético. Os respectivos sobrenadantes apresentaram sinais bem fracos dos polissacarídeos heteroramnana e quitosana, demonstrando que estes foram complexados quase que por completo nos hidrogéis, confirmando com os resultados observados no rendimento da formação destes hidrogéis (pág. 108).

FIGURA 32. COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DE HETERORAMNANA, QUITOSANA E DOS SOBRENADANTES 2:1 E 1:1



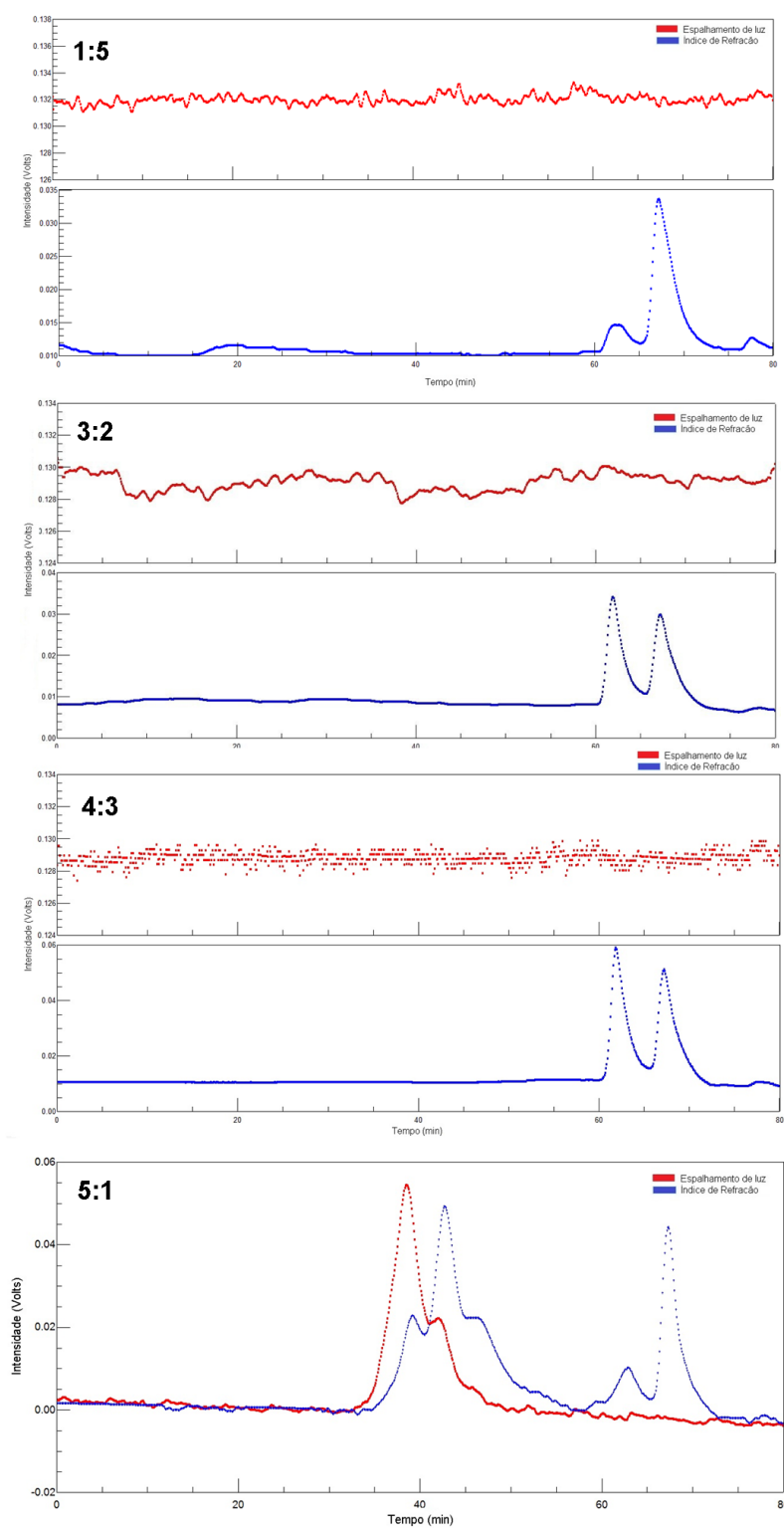
Solvente: D_2O com ácido acético 1%. Temperatura: 30°C . Padrão Interno: Acetona (2,225 ppm).

4.2.4.2 Análise de Homogeneidade por HPSEC-MALLS-IR

A partir dos resultados de RMN de ^1H dos sobrenadantes, foram selecionadas para as análises de homogeneidade por HPSEC-MALLS-IR as amostras 1:5, 3:2, 4:3 e 5:1 (Figura 33), que apresentaram espectros distintos entre si e demonstram padrões similares e representativos das outras amostras, como descrito anteriormente.

A partir das análises, observa-se que as amostras 1:5, 3:2 e 4:3 não houve refração e difração da luz, demonstrando ausência de moléculas no sobrenadante. No entanto, no sobrenadante 1:5, era de se esperar a presença da quitosana, visto que os sinais nas análises de RMN foram observados (pág. 125). Tanto a quitosana, como os sobrenadantes, foram solubilizados em ácido acético, seguido da liofilização e ressuspensão na fase móvel. A fase móvel utilizada para as análises de homogeneidade é uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2 0,1 M), e apesar da quitosana e os sobrenadantes demonstrarem solúveis em NaNO_2 , possivelmente ficaram suspensas como micropartículas e retidas no filtro de $0,22\ \mu\text{m}$.

FIGURA 33. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-RID DOS SOBRENADANTES



As análises por HPSEC podem ser uma opção para determinar a massa molecular da quitosana. No entanto, fatores como a solução utilizada na fase móvel, podem provocar a agregação do polissacarídeo, promovendo valores

superestimados (KRATOCHVIL, 1987). Devido as características policatiônicas da quitosana, uma pequena concentração de eletrólitos aniônicos de baixa massa molecular devem ser adicionados a fase móvel, evitando, deste modo, a formação destes agregados (TSAIH; CHEN, 1999). Neste aspecto, outras análises serão necessárias para observar a presença de quitosana remanescente nos sobrenadantes analisados, sendo necessário determinar a fase móvel ideal para os dois polissacarídeos presentes na amostra.

O sobrenadante 5:1 apresentou perfis polidispersos, demonstrando a presença de polímeros com diferentes massas moleculares e perfil muito similar ao obtido no extrato Gb1 (Figura 6, pág. 80). A partir das análises do sobrenadante pode-se concluir que em proporções à cima de 4 ou 5 vezes de heteroramnana, grande parte deste polissacarídeo não se integra ao complexo polieletrólito formado, ficando remanescente no sobrenadante.

4.2.5 Análise Ultraestrutural dos Hidrogéis HQ por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

4.2.5.1 Padrão Estrutural da Superfície dos Hidrogéis HQ

A partir das análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível observar o padrão de polimerização e a ultraestrutura da superfície externa dos hidrogéis formados por diferentes concentrações de heteroramnana:quitosana (HQ), sendo distintos entre si (Figura 34).

A partir da Figura 34, pode-se observar na Imagem 1 o padrão formado do hidrogel HQ 1:1, este apresenta duas faces distintas de polimerização quando observados em menor magnitude. Verifica-se uma área com superfície regular plana de aspecto liso e homogêneo, observando-se na Imagem 3, em maior magnitude, que esta área apresenta um aspecto de filme de fina espessura, com áreas rasgadas. A Imagem 2 evidência padrão de polimerização de aspecto irregular formado por uma malha heterogênea, nesta área vê-se dois padrões de polimerização, uma densa formada por maior compactação ou agregação, e outra mais flocular, sendo visível em maior magnitude na Imagem 4. Pode-se ver também, um arranjo de aspecto fibrilar e com porosidades (Imagem 5) contendo na sua

extremidade agregados floculares (Imagem 6), demonstrando ser uma malha aberta. A presença de inúmeras perfurações sugere ser um hidrogel de baixa densidade.

Na Imagem 7 evidencia-se em menor magnitude o hidrogel 1:4 polimerizado em sua grande extensão. Este demonstra ter dois padrões bem distintos de polimerização. Observa-se padrão de polimerização com superfície lisa, plano, homogêneo, regular, integrando grande extensão deste hidrogel. Em maior magnitude (Imagem 9 e 10) verifica-se que esta superfície apresenta um relevo contendo algumas ondulações, possivelmente decorrente do processamento da desidratação pelo ponto crítico. A outra interface, apresentou o mesmo padrão descrito anteriormente (Imagem 8), já descrito para o hidrogel de proporção 1:1.

Na Imagem 11, em menor magnitude, o hidrogel 1:5 é formado por uma arquitetura irregular. No entanto, quando observado em maior magnitude, vê-se que esta irregularidade arquitetônica apresenta o mesmo padrão de polimerização. A estrutura fina é composta por uma polimerização de forma homogênea, com uma sutil diferença no padrão de polimerização, vê-se grande extensão do hidrogel de aspecto homogêneo, regular, plano (Imagem 14), inter cruzando-se com áreas observadas em menor extensão (Imagem 13), as quais, quando observadas em maior magnitude (Imagem 15) apresentam aspecto fibrilar.

Na Imagem 16 observa-se que o hidrogel 2:1, em sua maior extensão apresenta uma superfície de aspecto irregular. Verifica-se que esta interface esta diretamente em contato com um padrão distinto de polimerização (Imagem 17), sendo este, conforme já descrito anteriormente, de aspecto plano homogêneo regular de superfície lisa. Desta forma, este hidrogel apresenta duas interfaces. Chama a atenção destas Imagens (16, 17 e 18) que o padrão de polimerização irregular, além de ser formado por uma malha de aspecto fibroso que se interconectam, apresentam áreas mais densas e também áreas de aspecto flocular. Esta área irregular (Imagem 20), diferente do que observado para os outros hidrogéis, apresenta características perfurações de maior ou menor diâmetro. Possivelmente, a presença dessas perfurações de forma regulares ao longo de toda a extensão dessa superfície, leva a supor que este hidrogel apresenta uma menor densidade, sendo menos denso que o hidrogel 1:4 na sua face irregular. A outra interface (Imagem 19) de aspecto plano e homogêneo apresentou-se semelhante, conforme já descrito, para os hidrogéis 1:1 e 1:4.

O hidrogel HQ 3:2 (Imagem 21) apresenta predominância de uma polimerização com características lisa, plana e regular (Imagem 21 e 23), integrando uma grande proporção. Pode-se observar que dentre as características já descritas para os demais hidrogéis, este padrão plano de polimerização em algumas áreas evidencia um material adsorvido sob o mesmo (Imagem 24). Este hidrogel apresenta uma menor proporção de polimerização de forma irregular (Imagem 21, 22, 25 e 26), com características semelhantes ao descrito para o hidrogel 1:1 e 2:1.

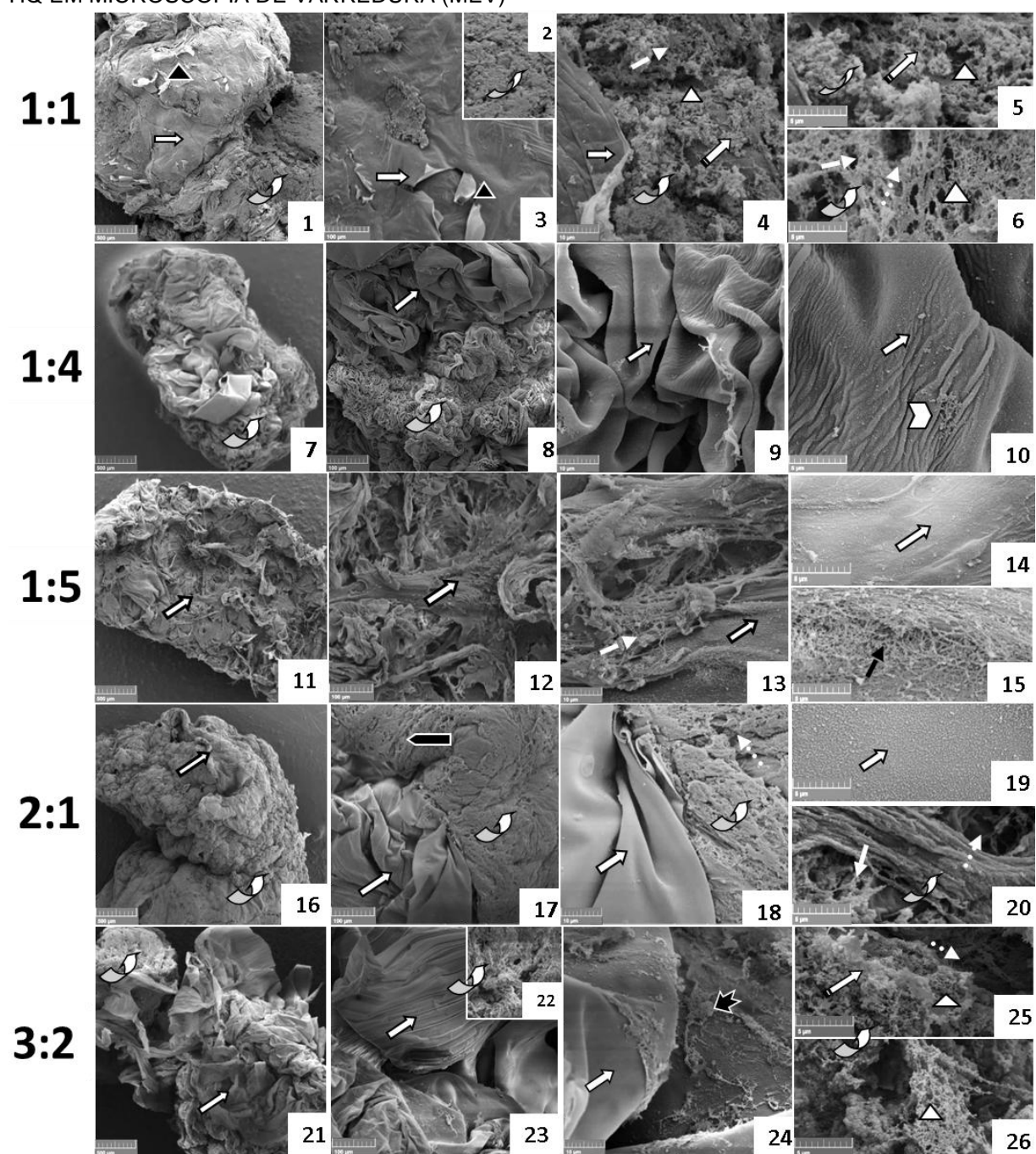
Nas Imagens 27, 28, 29 e 30 observa-se que o hidrogel 4:1 apresenta um padrão regular de polimerização. Não foi observado áreas de interface, verificando um predomínio de relevo homogêneo plano, contendo algumas dobras, possivelmente em decorrência da desidratação pelo ponto crítico. Em maior magnitude (Imagem 32), por sobre o mesmo, também se evidencia um material adsorvido semelhante ao observado no hidrogel 3:2. Nas Imagens 31, 32, 33 e 34 observa-se que o hidrogel 4:3 apresenta uma arquitetura com aspecto irregular, sendo semelhante a porção irregular do hidrogel 2:1, verificando-se uma organização fibrilar, flocular com perfurações mais esparsas.

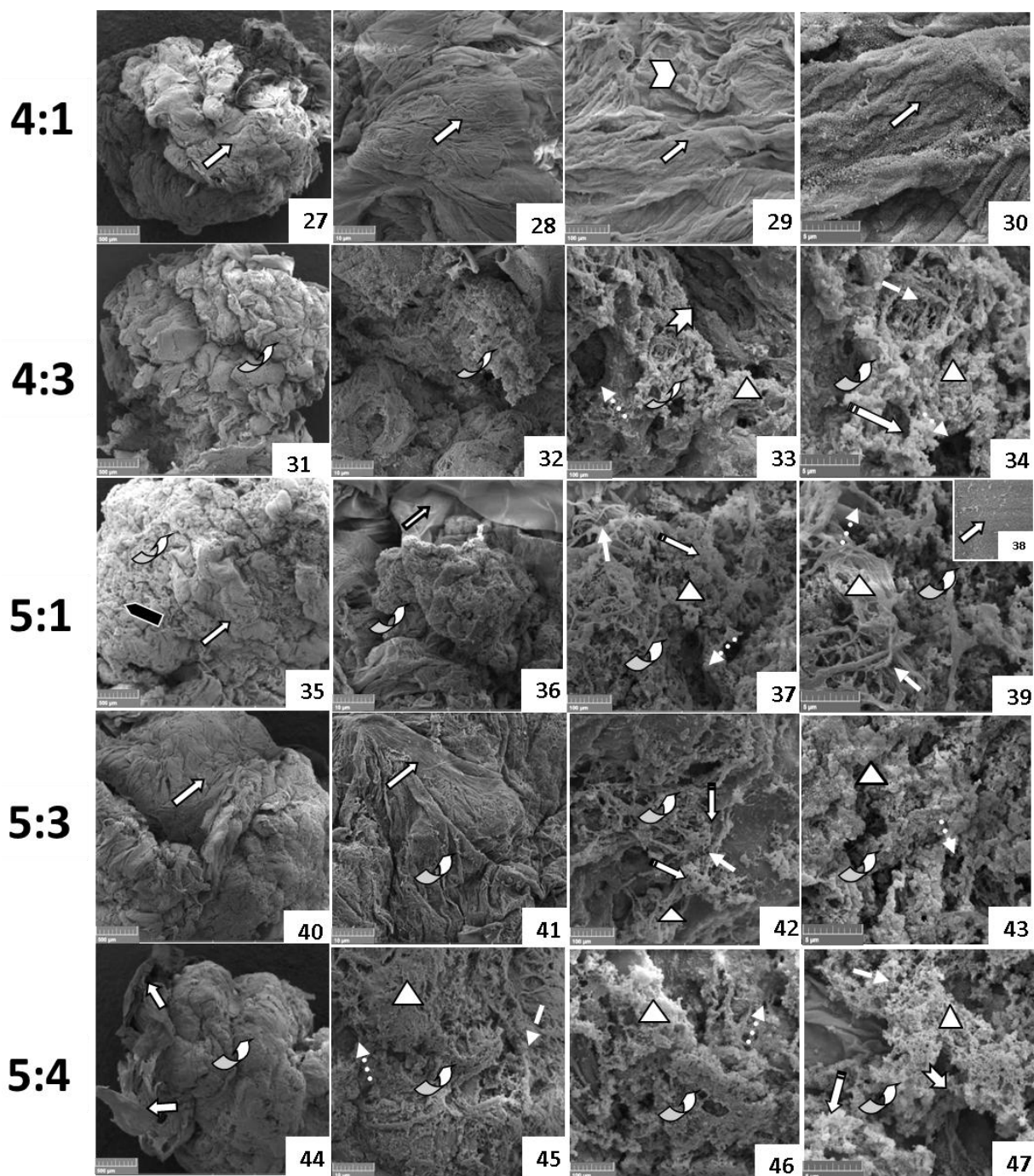
O hidrogel 5:1 (Imagens 35, 36, 37, 38 e 39), de forma semelhante ao hidrogel 4:3, apresenta uma superfície externa de aspecto irregular. Por entre a malha formada há poucas superfícies de forma plana lisa regular (Imagem 35 e 36), e a maior extensão do hidrogel apresenta característica aspecto fibrilar organizado em uma malha aberta (Imagens 37 e 39). Por entre estas fibras, há um predomínio de arranjo flocular em agregados. Não foi observada a presença de perfurações neste hidrogel, no entanto, este foi o hidrogel que apresentou a formação de fibras mais evidentes com diâmetros e comprimentos semelhantes. Na Imagem 38, observa-se em maior magnitude, a superfície lisa do hidrogel, sendo esta regular, homogênea, lisa, plana e contendo esparsos materiais particulados sobre o mesmo.

As Imagens 40, 41, 42 e 43 evidenciam as duas interfaces características do hidrogel HQ 5:3. Observa-se um maior predomínio da superfície homogênea, lisa e plana (Imagem 40 e 41), e uma menor área de superfície irregular contendo aspecto fibrilar pouco flocular (Imagem 42), assim como áreas de agregados floculares justapostas (Imagem 43). Por entre essas áreas observa-se uma malha contendo perfurações (Imagem 43). No hidrogel HQ 5:4 (Imagens 44, 45, 46 e 47) há um predomínio de área irregular, sendo que esta área irregular apresenta características morfológicas e ultraestruturais semelhantes a do hidrogel 5:3. Observa-se uma

menor proporção de área lisa, homogênea e plana, estando esta área desaderida sem contato direto com o hidrogel (Imagem 44).

FIGURA 34. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA ARQUITETURA SUPERFICIAL DOS HIDROGÉIS HQ EM MICROSCOPIA DE VARREDURA (MEV)





	Face de polimerização rugosa, superfície irregular
	Face regular plana de aspecto liso e homogêneo
	Filme de fina espessura, áreas rasgadas
	Aspecto irregular formado por uma malha heterogênea
	Áreas nitidamente mais flocular
	Aspecto fibrilar
	Malha de aspecto mais aberto
	Superfície lisa plano homogêneo regular contendo algumas ondulações
	Perfurações regulares de diâmetros semelhantes
	Perfurações irregulares de diferentes diâmetros
	Material adsorvido sob o hidrogel

As Imagens panorâmicas 1, 7, 11, 16, 21, 27, 31, 35, 40 e 44 estão na magnitude de 100x. As Imagens 2, 3, 8, 12, 17, 22, 23, 28, 32, 36, 41 e 45 estão na magnitude de 500x. As Imagens 4, 9, 13, 18, 24, 29, 33, 37, 42 e 46 estão na magnitude de 5000x. As Imagens 5, 6, 10, 14, 15, 19, 20, 25, 26, 34, 38, 39, 43 e 47 estão na magnitude de 13000x. As análises foram realizadas em duplicata.

4.2.5.2 Análise Ultraestrutural da Arquitetura Interna dos Hidrogéis HQ em Microscopia de Varredura (MEV) por Congelamento e Quebra

Nas análises por MEV observa-se a ultraestrutura interna dos hidrogéis formados por diferentes concentrações de heteroramnana:quitosana (HQ) verificando-se a formação de duas estruturas distintas (Figura 35).

A partir da Figura 35, pode-se observar a estrutura interna do hidrogel 1:1 nas Imagens 1, 2 e 3, verificando que nesta proporção a polimerização interna evidência dois padrões bem distintos, uma face lisa a qual forma lamelas que se dobram entre si, formando aberturas de grande diâmetro. O outro padrão de polimerização forma uma malha mais tênue, em maior magnitude, é possível verificar que a mesma tem um aspecto flocular, sugerindo malha aberta características de um hidrogel não denso. Diferentemente, nas Imagens 4, 5 e 6 observa-se que o hidrogel HQ 1:4, de forma evidente, é formado por uma matriz organizada na forma de lamelas, sendo estas, com arranjos bem organizados e homogêneos. Observam-se também nítidas nervuras dispostas em sentido longitudinal, que integram a arquitetura das lamelas. Verifica-se que essas lamelas dobram-se entre si mantendo diferentes espaçamentos por entre elas, sendo a parte interna deste hidrogel composto basicamente por empilhamento de lamelas.

No hidrogel HQ 1:5 (Imagens 7, 8 e 9) observa-se que a arquitetura interna deste hidrogel também é composta por estruturas lamelares, as quais de forma evidente apresentam-se justapostas com maior grau de compactação. No empilhamento de lamelas, verifica-se presença de maiores ou menores aberturas, sendo de menores diâmetros e extensão, quando comparados ao hidrogel 1:4. A alta compactação e sobreposição de inúmeras lamelas nos levam a pensar que é um hidrogel mais compacto quando comparado aos anteriores.

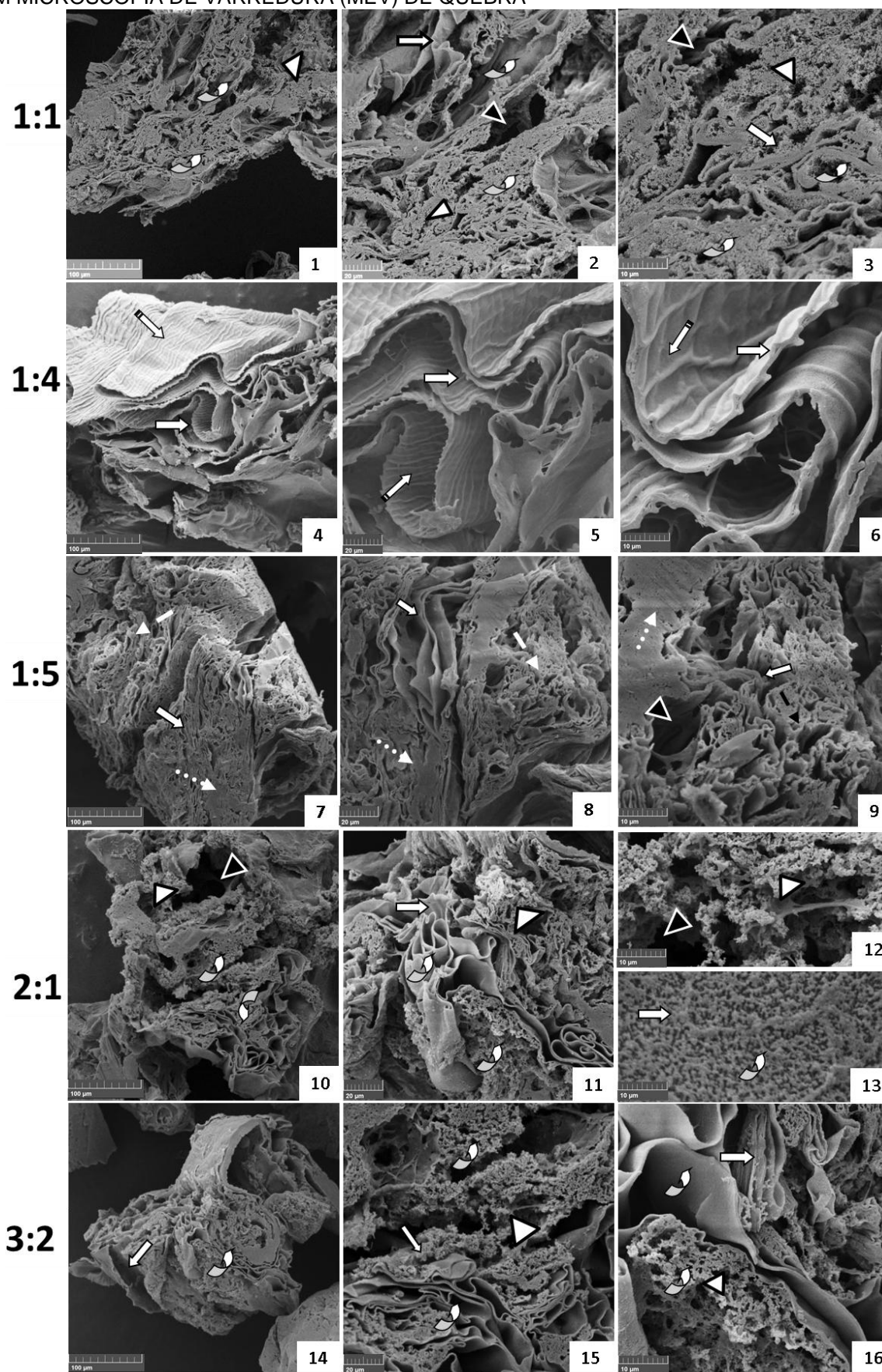
Os hidrogéis HQ 2:1 (Imagens 10, 11, 12 e 13), 3:2 (Imagens 14, 15 e 16), 4:3 (Imagens 20, 21 e 22) e 5:4 (Imagens 29, 30 e 31) apresentam estruturas internas muito similares entre si. Pode-se observar nas Imagens 10, 11, 12, 14, 15 e 16, que ambos os hidrogéis apresentam padrão de polimerização em duas faces

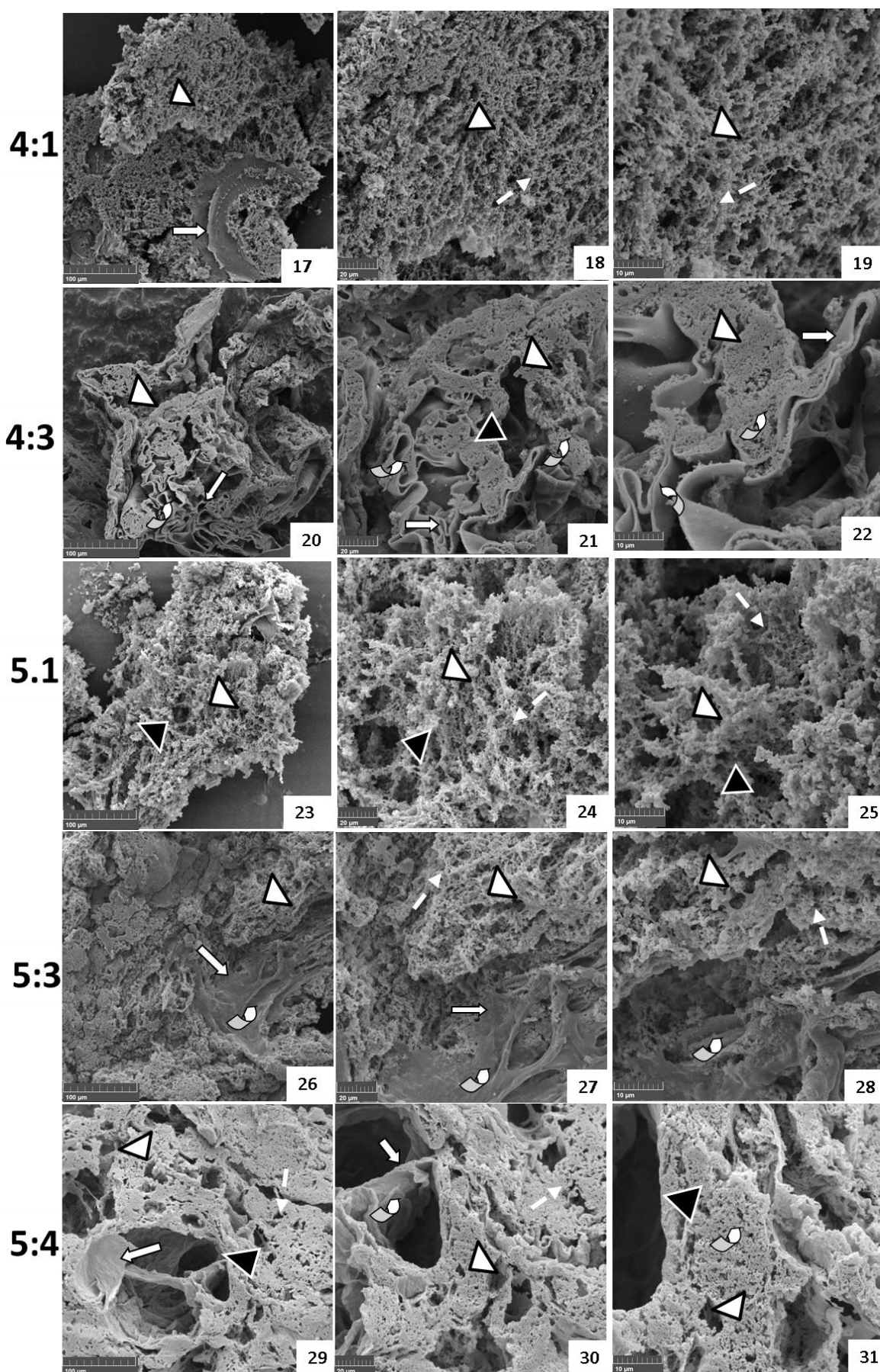
bem distintas, semelhante ao hidrogel HQ 1:1. Observa-se uma área lamelar lisa, plana, homogênea, formando dobras entre si, não justapostas, com grandes espaços, de grande diâmetro e extensão. A Imagem 13 evidencia em maior magnitude o padrão homogêneo e liso dessas lamelas. Essas faces de polimerização lisa permeiam um outro padrão de polimerização, formado por agregados floculares com arranjo de aspecto lábil e aberto, características também observadas no hidrogel 1:1.








Nas Imagens 17, 18 e 19, observa-se de forma interessante que o hidrogel 4:1, onde 4 sugere ser pela proporção empregada, a polimerização característica de heteroramnana e 1 de quitosana, pode-se concluir que o aspecto fibrilar e flocular em associação com uma malha lábil, aberta e pouco densa é característica da polimerização da heteroramnana, sendo observado em maior proporção. Na Imagem 17 é possível observar uma pequena área do padrão de polimerização da quitosana, com aspecto homogêneo, liso e plano em uma proporção muito reduzida. Podemos supor que esta arquitetura observada, condiz com um hidrogel de características lábeis, frouxa, aberta e pouco compacta. O hidrogel HQ 5:1 (Imagens 23, 24 e 25) apresentou características bem similares ao hidrogel 4:1, confirmando que a heteroramnana é a responsável pela estrutura com aspecto fibrilar e flocular, enquanto que a quitosana, pelo aspecto homogêneo, liso e plano.

No hidrogel 5:3 (Imagens 26, 27 e 28) observa-se um padrão de polimerização em duas interfaces, onde o padrão irregular é formado por fibrilas, material floculado, agregados e compactados entre si, sendo o padrão majoritário deste hidrogel. É um hidrogel que apresenta poucas perfurações, e quando comparados com o hidrogel 5:1 e 4:1, observa-se menor quantidade destas, e em menor extensão e diâmetro. Neste hidrogel, também verifica-se que ocorreu uma compactação, sendo possível observar um nítido colapso do padrão fibrilar e flocular, característico da heteroramnana, e, supostamente, apresentando um maior grau de densidade quando comparado com o hidrogel 5:1.

FIGURA 35. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA ARQUITETURA INTERNA DOS HIDROGÉIS HQ EM MICROSCOPIA DE VARREDURA (MEV) DE QUEBRA





	Interfaces de polimerização
	Face lisa, com lamelas sobrepostas
	Malha composta por perfurações de grande diâmetro
	Malha tênue, flocular sugerindo uma malha aberta
	Nervuras
	Perfurações de diferentes diâmetros
	Malha densa

As Imagens 1, 4, 7, 10, 14, 17, 20, 23, 26 e 29 estão na magnitude de 750x. As Imagens 2, 5, 8, 11, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 estão na magnitude de 2000x. As Imagens 3, 6, 9, 12, 13, 16, 19, 22, 25, 28 e 31 estão na magnitude de 5000x. As análises foram realizadas em duplicata.

Análises das estruturas lamelares e porosas formadas nos hidrogéis de heteroramnana: quitosana foram realizados, sendo avaliados a espessura das lamelas, o espaçamento entre elas e o tamanho dos poros formados. Esses valores podem ser observados na Tabela 8, verificando-se um padrão nos hidrogéis que apresentaram estrutura lamelar no seu interior, com espessuras médias variando entre 1 a 2 μm . Em contrapartida, o espaçamento gerado entre as lamelas não apresentaram um padrão, observando-se que o hidrogel HQ 1:4 foi o que demonstrou o maior espaçamento entre estas estruturas. Estes resultados confirmam com as análises de absorção de fluídos (pág. 110), onde verifica-se que o hidrogel 1:4 foi o que demonstrou uma alta absorção inicial de fluídos, possivelmente em decorrência da sua estrutura facilitar a internalização de fluídos. No entanto, o hidrogel 1:4 apresentou pouca resistência estrutural para manter-se intumescido.

Em relação ao tamanho dos espaços, perfurações ou poros (Tabela 8), observa-se que as amostras apresentaram tamanhos médios padrão variando entre 7 a 8 μm , com exceção das amostras 5:1 e 5:4. Nas análises de absorção de fluídos, observa-se que o hidrogel 5:1, juntamente com 4:1, apresentaram degradação da sua estrutura nas primeiras 48h. A presença da estrutura porosa em maior proporção demonstra formar hidrogéis com características de alta absorção inicial, porém com pouca resistência estrutural para manter o fluído internamente, como descrito anteriormente. O hidrogel 5:4, no entanto, demonstrou poros com tamanhos médios maiores, mas não apresentou degradação da sua estrutura quando intumescido por fluídos. Este hidrogel, assim como 2:1, 3:2 e 4:3, apresentam em sua estrutura tanto a organização lamelar, como a porosa, e características similares na capacidade de absorção de fluídos, sugerindo que a presença das duas estruturas organizacionais são essenciais para a capacidade de absorção de fluídos e a manutenção da estrutura intumescida.

TABELA 8. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DAS ESTRUTURAS LAMELARES E POROSAS FORMADAS NOS HIDROGÉIS DE HETERORAMNANA:QUITOSANA (H:Q)

H:Q	Espessura das lamelas (μm)			Espaçamento entre lamelas (μm)			Tamanho dos poros (μm)		
	Média	Máx	Mín	Média	Máx	Mín	Média	Máx	Mín
1:1	1,0	2,0	0,89	4,0	5,0	3,0	---	---	---
1:4	2,0	3,0	1,0	20,0	33,0	7,0	---	---	---
1:5	0,85	1,0	0,45	5,0	12,0	2,0	---	---	---
2:1	1,0	2,0	0,68	9,0	27,0	3,0	7,0	12,0	3,0
3:2	1,0	3,0	0,91	7,0	14,0	3,0	8,0	13,0	3,0
4:1	---	---	---	---	---	---	7,0	15,0	3,0
4:3	2,0	3,0	0,91	7,0	19,0	2,0	7,0	16,0	3,0
5:1	---	---	---	---	---	---	14,0	26,0	6,0
5:3	---	---	---	---	---	---	7,0	10,0	5,0
5:4	2,0	2,0	1,0	7,0	15,0	4,0	18,0	53,0	7,0

*Para os cálculos, foram considerados 10 medições de cada estrutura.

A estrutura tridimensional formada por biomateriais é uma característica que pode ser determinante na aplicação do mesmo. As estruturas contendo poros com diâmetro superior a 50 μm podem ser definidas como macroporos, enquanto que, poros com diâmetros menores que 10 μm são definidas como micro ou nanoporos (HOLZAPFEL et al., 2013). Hulbert e colaboradores (1970) demonstraram que para biomateriais aplicados na regeneração óssea, o tamanho mínimo ideal dos poros nas estruturas é 100 μm . Em implantes observou-se que poros com tamanhos superiores a 300 μm melhoravam o processo de osteogênese (HARVEY et al., 1999), enquanto que em poros de menor diâmetro, o processo era inverso, causando ossificação. Foi observado que além do tamanho dos poros, a interconectividade entre eles tem grande importância para o processo de osteogênese, permitindo a difusão das células, proliferação e a troca de nutrientes por todo o biomaterial (KUBOKI et al., 1998).

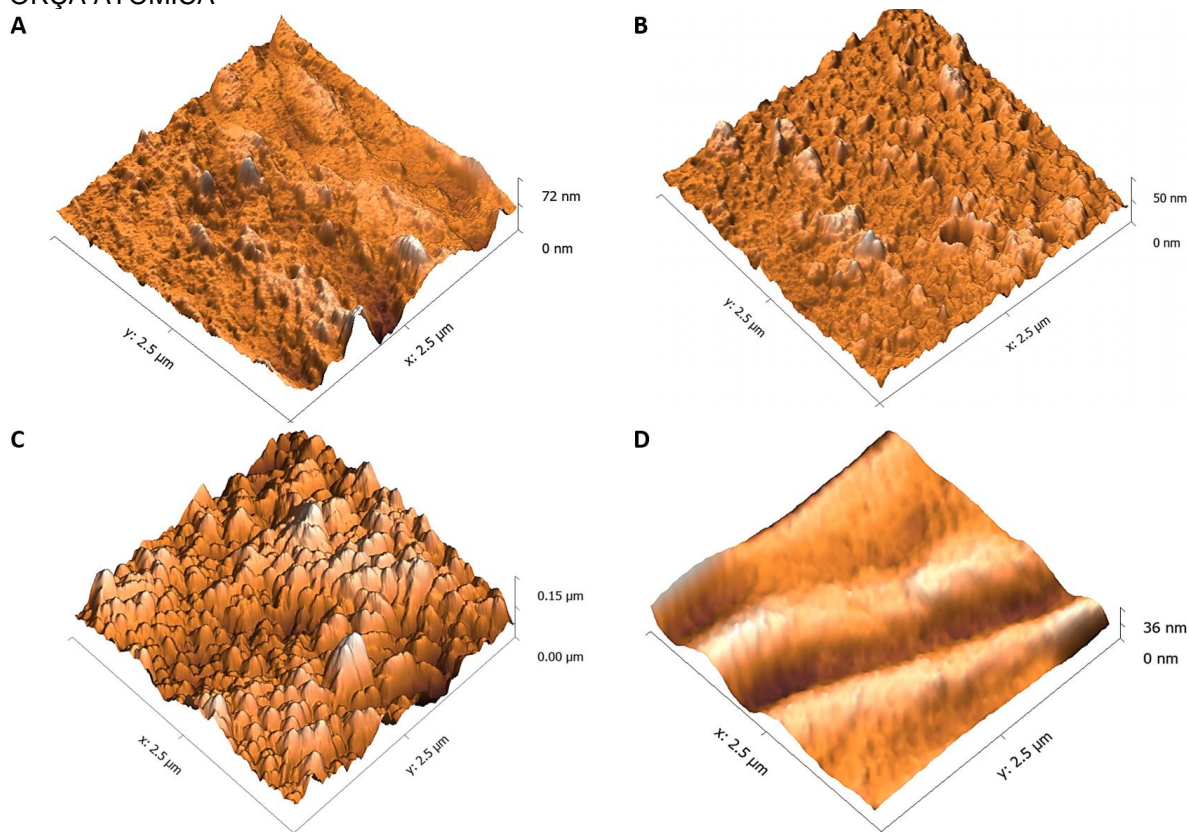
Para estruturas com micro ou nanoporos, como o observado nos hidrogéis formados de heteroramnana:quitosana, a presença dessas estruturas permite um aumento da área de superfície do biomaterial, e consecutivamente, intensifica a adsorção de fatores de indução de diferenciação celular e troca iônica. Os micro e nanomateriais oferecem características muito similares ao da matriz extracelular, consistindo de fibras no nível micro e nano, e a partir destas estruturas, promovendo

um aumento na relação superfície/volume, e deste modo, aumentando a superfície de contato e facilitando a interação entre células e o biomaterial (HOLZAPFEL et al., 2013).

4.2.6 Análise da Topografia e Rugosidade dos hidrogéis por Microscopia de Força Atômica

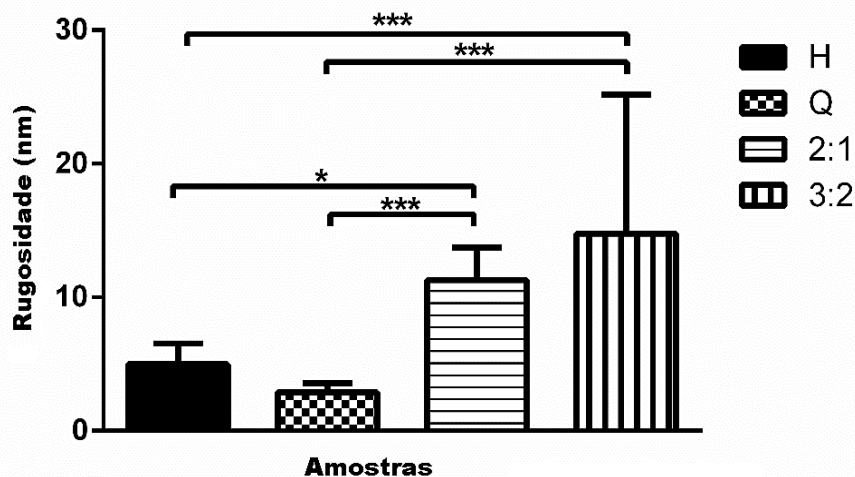
A partir das análises por Microscopia de Força Atômica (AFM) foi possível analisar a topografia e rugosidade da superfície dos hidrogéis HQ 2:1 e 3:2, assim como, das amostras formadas somente pelos polissacarídeos heteroramnana e quitosana. Observa-se que o aspecto estrutural da superfície dos polissacarídeos isolados e hidrogéis é irregular e rugoso (Figura 36). As amostras formadas por heteroramnana (Imagem A) e quitosana (Imagem B) demonstram menor rugosidade em relação aos hidrogéis HQ 2:1 (Imagem C) e 3:2 (Imagem D).

FIGURA 36. TOPOGRAFIA DOS POLISSACARÍDEOS HETERORAMNANA (A), QUITOSANA (B) E HIDROGÉIS HQ 2:1 (C) E 3:2 (D) EM PERSPECTIVA 3D POR ANÁLISES DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA



Os valores de rugosidade média das superfícies dos polissacarídeos heteroramnana e quitosana foram 4.99 ± 0.40 e 2.89 ± 0.17 nm, respectivamente, enquanto que dos hidrogéis HQ 2:1 e 3:2 foram 11.27 ± 0.63 e 14.76 ± 2.69 nm, respectivamente (Gráfico 2).

GRÁFICO 2. COMPARAÇÃO DA RUGOSIDADE DA SUPERFÍCIE DOS HIDROGÉIS HQ 2:1 E 3:2 COM OS HIDROGÉIS DE HETERORAMNANA E QUITOSANA



***Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.001$), * Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$), $n=15$.

Em estudos realizados por Assis e Silva, (2003), observou-se a formação de filmes de quitosana apresentando topografia irregular e nanoporosa, configurando uma estrutura do tipo “montanhas e vales”. A partir de diferentes concentrações de quitosana verificou-se íntima relação entre a concentração de polissacarídeo e o aumento da rugosidade destes filmes. Resultados similares foram observados por Amaral e colaboradores (2006), onde filmes de quitosana apresentaram topografia irregular e estrutura similar do tipo “montanhas e vales”, com valores de rugosidade média de 2.01 nm. Em contrapartida, quando a quitosana é complexada à outras moléculas, como o surfactante SDS, verifica-se um aumento significativo da rugosidade da superfície dos filmes formados. Este aumento foi relacionado a coagulação das cadeias poliméricas causado pelas moléculas surfactantes (HUANG et al., 2001).

Robic e colaboradores (2009b) investigaram por AFM a estrutura de filmes produzidos com ulvanas em água. Foi observado a formação de agregados com estruturas características na forma arredondada ou de fibras. No mesmo estudo, foi observado a influência da presença dos íons borato e cobre na formação dos filmes

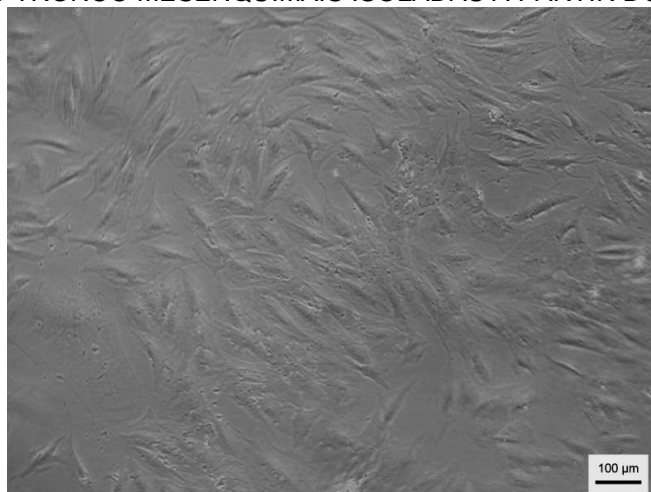
de ulvana, e verificou-se a formação de filmes mais densos e rugosos, formando estruturas na forma de *beads*.

No presente trabalho foi verificado que a interação entre heteroramnana e quitosana promove a formação de hidrogéis com superfícies de aspecto estrutural mais rugoso quando comparado com os polissacarídeos isolados. Esta interação pode promover alterações na conformação das moléculas, e desta forma, formar estruturas mais rugosas.

4.3 ANÁLISES BIOLÓGICAS

Para as análises biológicas foram isoladas amostras de 13 pacientes saudáveis submetidos à cirurgia de abdominoplastia, com idades entre 22 e 62 anos, todas com o prévio consentimento da doação do tecido adiposo (Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pág. 207). Após o isolamento das células, estas foram mantidas em cultivo, observando a partir do terceiro dia a capacidade aderente ao substrato e morfologias com aspecto estrelado, semelhantes ao fibroblasto. Também apresentaram um crescimento rápido, atingindo a confluência de 80% em aproximadamente 7 dias de cultivo (Figura 37).

FIGURA 37. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS À PARTIR DO TECIDO ADIPOSEO



Amostra A2, em P2 e com aproximadamente 90% de confluência (Aumento em 100x).

Destas amostras, somente dez foram utilizadas para posterior análise, as outras três amostras tiveram problemas de contaminação durante o processo de isolamento e tiveram que ser descartadas. A contaminação pode ter ocorrido desde a coleta do material no procedimento cirúrgico pela equipe médica e/ou

acondicionamento posterior até durante o processo de isolamento e cultivo celular no laboratório.

4.3.1 Rendimento Celular

Na Tabela 9 são apresentadas características das amostras de tecido adiposo utilizadas para o isolamento das células-tronco mesenquimais. A partir do isolamento das células do tecido adiposo, verificou-se um rendimento celular com concentrações variando entre 0,6 a 5,2 ($\times 10^6/\text{mL}$) a partir de amostras contendo de 7 a 47 g de tecido adiposo (Tabela 9). Valores similares foram obtidos em outros estudos, demonstrando uma mesma variação no rendimento celular, que pode estar relacionado com a idade do doador e a localização em que o tecido adiposo foi obtido (LEI et al., 2007; IRIODA et al., 2016).

TABELA 9. CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS DE TECIDO ADIPOSEO UTILIZADAS PARA O ISOLAMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E RENDIMENTO CELULAR

Amostras	Idade do doador	Peso da amostra (g)	Concentração de células ($\times 10^6/\text{mL}$)	Rendimento celular proporcional (Concentração de células/Peso)
A1	43	37,7	2,1	0,06
A2	41	35,9	4,9	0,14
A3	36	47,3	3,2	0,07
A4	62	44,9	0,6	0,01
A5	40	41,1	5,2	0,13
A6	38	7,6	2,6	0,34
A7	47	44,8	2,4	0,05
A8	35	13,1	1,7	0,13
A9	40	11,6	4,8	0,41
A10	50	20,8	3,5	0,17
A11	22	17,4	1,8	0,10
A12	28	14,3	3,2	0,22
A13	42	17	3,3	0,2

A amostra A4 foi a que apresentou o menor rendimento celular proporcional. Este baixo rendimento pode estar relacionado com a idade mais avançada da doadora. Nos estudos realizados por Lei e colaboradores (2007), verificou-se que com o avanço na idade humana, o rendimento e a capacidade proliferativa das células-tronco diminuem. Estes fatores podem estar relacionados com a diminuição progressiva na capacidade de regeneração de diversos tecidos conforme o avanço

da idade.

As amostras A6 e A9 foram as que apresentaram os melhores rendimentos celulares proporcionais, sendo de doadores de faixa etária similar (aproximadamente 40 anos). No entanto, não é possível correlacionar o rendimento celular proporcional com a idade dos doadores, visto que outros fatores como a localização em que o tecido adiposo foi obtido podem influenciar na quantidade de células-tronco presentes. Jurgens e colaboradores (2008) demonstraram ter maior concentração de células na região abdominal quando comparada com a região do quadril e do interior da coxa. Em outro estudo, no entanto, não se verificou diferenças significativas na concentração de células obtidas a partir de diferentes partes do corpo humano (PADOIN et al., 2008).

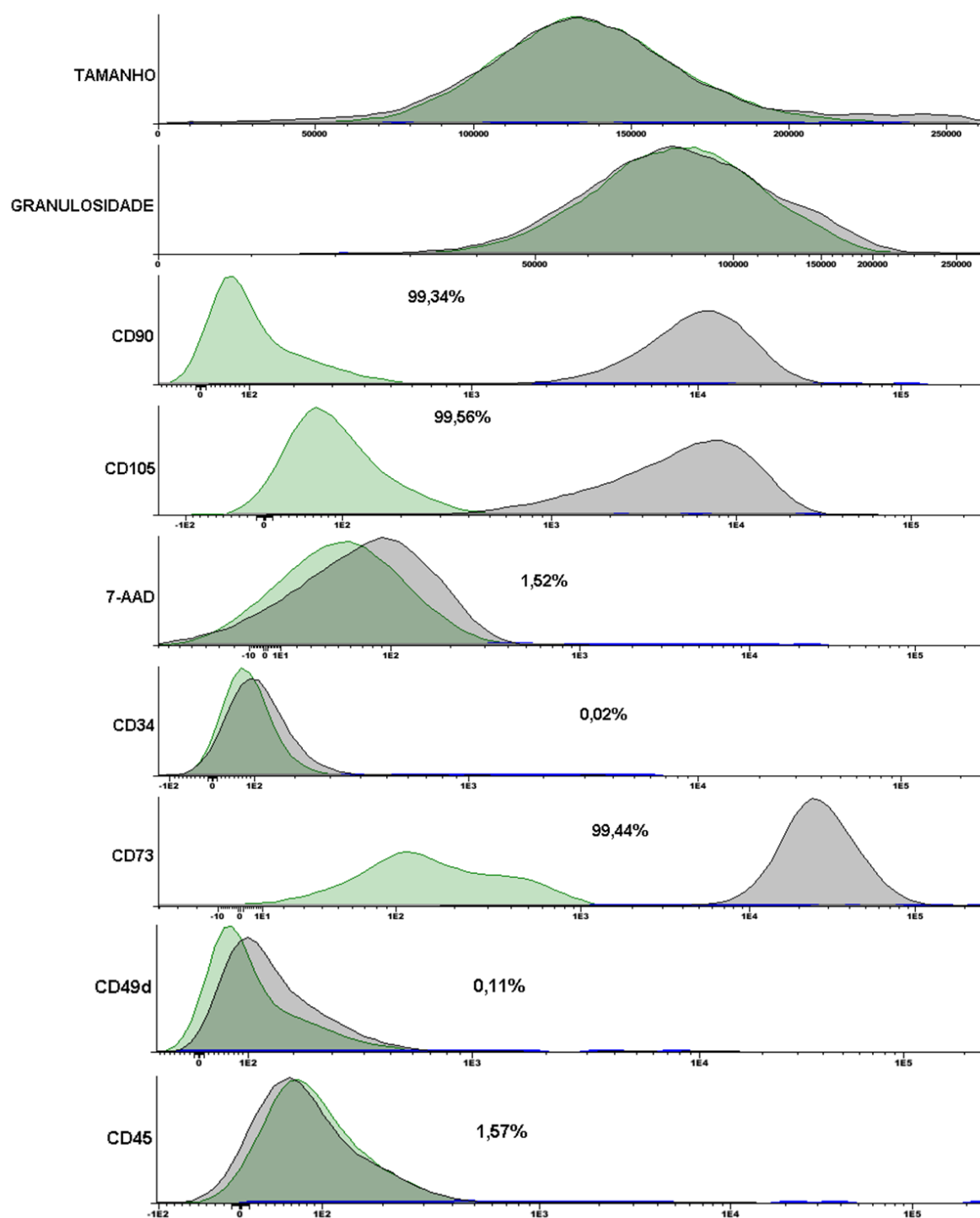
O tecido adiposo é formado por uma fração estromal que pode ser facilmente isolada. Esta fração consiste de uma mistura heterogênea de células, que além das CTM, pode incluir células endoteliais, fibroblastos, pericitos, mastócitos, células de músculo liso e pré-adipócitos (ZUK et al., 2002). No processo de isolamento das CTM, essas células podem ser contabilizadas, gerando valores superestimados para o rendimento celular. Neste aspecto, não é possível correlacionar o rendimento celular proporcional com a idade do doador, visto que as amostras de tecido adiposo foram coletadas por médicos cirurgiões diferentes, podendo haver variações no modo de coleta do tecido adiposo para cada paciente e sem uma padronização exata na obtenção deste material. Além do número de amostras ser insuficiente para conclusões estatísticas desta natureza, este não foi objetivo do estudo.

4.3.2 Caracterização das CTA

4.3.2.1 Análise Imunofenotípica das CTA

A análise imunofenotípica dos marcadores de superfície foi realizada através da citometria de fluxo e os resultados foram analisados com o auxílio do software Infinicity. Os resultados estão expressos em porcentagem pela sobreposição da marcação de expressão do CD específicos com a marcação do controle isotópico (Figura 38).

FIGURA 38. HISTOGRAMA DA AMOSTRA A4



A cor verde representa o controle isotípico e a cor cinza representa o marcador específico.

Os valores médios, máximos e mínimos (em percentuais) de cada marcador (CD34, CD45, CD49d, CD73, CD90, CD105 e 7-AAD) podem ser visualizados na Tabela 10. A partir das análises imunofenotípicas por marcadores específicos, observa-se que as amostras isoladas apresentaram um padrão de expressão

positivo para os marcadores CD73, CD90, CD105, e negativos para os marcadores CD34, CD45 e CD49d (Figura 38). Na literatura, existem divergências quanto aos marcadores de expressão das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTA), mas muitos estudos estão de acordo com os utilizados na imunofenotipagem de células-tronco mesenquimais da medula óssea (BM-MSC) CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD45⁻ e CD14⁻ (WAGNER et al., 2005; KERN et al., 2006). De acordo com a *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), a expressão dos marcadores de superfície CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺ e CD45⁻, confere com um dos requisitos para a validação como células-tronco mesenquimais.

TABELA 10. EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE DAS CTA EM P4

	CD34-	CD45-	CD49d-	CD73+	CD90+	CD105+	7-AAD
Média	5,38	1,03	0,68	99,83	99,71	99,69	6,48
Máx.	12,66	1,62	1,29	99,98	99,87	99,85	12,2
Mín.	0,02	0,62	0,11	99,44	99,34	99,56	1,52

O marcador CD34 demonstrou um padrão negativo para as amostras analisadas, no entanto, observou-se que a amostra A4 apresentou maior expressão deste marcador (12,66%). O marcador CD34 pertence a família de proteínas transmembrana de superfície celular, e vem sendo relacionado com a promoção da proliferação, o bloqueio da diferenciação de células progenitoras e a migração de células hematopoiéticas (NIELSEN; MCNAGNY, 2008). Este marcador tem sido comumente utilizado para o isolamento e identificação de células endoteliais, células-tronco hematopoiéticas e seus progenitores no transplante de medula óssea (SATO et al., 1999).

É importante destacar que as análises imunofenotípicas foram realizadas na passagem 4 (P4) das células. Maumus e colaboradores (2011), demonstraram que as CTA expressam CD34 quando mantidas *ex vivo* em tecido adiposo humano intacto, no entanto, durante a expansão e proliferação dessas células em cultivo *in vitro*, a expressão deste marcador diminui consideravelmente. Outros pesquisadores também observaram resultados similares, verificando a diminuição progressiva da expressão de CD34 até no máximo na P4 (MITCHELL et al., 2006). Deste modo, observa-se que algumas células ainda mantêm expressão para CD34, mesmo após sucessivas passagens no cultivo.

Os marcadores CD34 e CD45 apresentam expressão imunofenotípica para linhagens de células hematopoiéticas e endoteliais. Em estudos realizados por Planat-Benard e colaboradores (2004), observa-se que as células inicialmente isoladas da fração vascular estromal do tecido adiposo expressavam esses marcadores, e após um período de 3-5 dias de cultivo, houve uma diminuição significativa desta expressão. Nas amostras analisadas, a baixa expressão destes marcadores pode demonstrar ausência ou níveis insignificantes destes tipos de células no cultivo isolado a partir do tecido adiposo.

O marcador CD49d não apresentou expressão significativa nas amostras analisadas. No entanto, na literatura existe certa divergência, onde alguns autores encontraram alta expressão (77-88%) deste marcador para as CTA (KATZ et al., 2005; IRIODA et al., 2016), enquanto outros observaram baixa expressão (9-14,3%) (GRONTHOS et al., 2001; ZUK et al., 2002; LEI et al., 2007). O CD49d pertence a família das α -integrinas, proteínas de superfície responsáveis na adesão estrutural para componentes da matriz extracelular ou para mediar a interação entre células, que podem ocorrer através da ligação com a fibronectina ou moléculas-1 de adesão celular vascular (VCAM-1), respectivamente (RUOSLAHTI, 1991).

Durante o ciclo de vida celular, as células podem sofrer diversas alterações, observáveis através da expressão gênica e até da sua morfologia. As células-tronco mesenquimais são células dinâmicas e podem mudar a expressão imunofenotípica no decorrer do cultivo, podendo sofrer alterações nas funções biológicas. Fatores como o meio de cultivo utilizado (com ou sem soro proteico, fatores de crescimento, etc.), natureza e processamento da amostra (origem, idade, vitalidade), estágio de maturação, e outros, podem afetar fenotipicamente e genotipicamente as células (KATZ et al., 2005; MOSNA; SENSEBE, 2010). Em estudos realizados por Irioda e colaboradores (2016), observou-se que o processo de criopreservação tem influência sob a expressão do marcador CD49d. Após o descongelamento, as CTA apresentaram uma redução de aproximadamente 10% na expressão deste marcador. As análises imunofenotípicas das CTA foram realizadas na passagem 4 após um período de 30 dias criopreservadas, este fator pode ter influenciado para a baixa expressão deste marcador.

A viabilidade das células foi analisada utilizando o Kit de viabilidade 7-AAD (BD). Quando as células apresentam algum comprometimento na integridade da membrana celular, o corante 7-AAD tem a capacidade de permear a membrana e

intercalar especificamente entre as bases G-C do DNA (SCHMID et al., 1992). As amostras apresentaram uma média de viabilidade de 93,5%, sendo a amostra A13 a que apresentou a maior taxa de mortalidade (12,2%). Visto que essas células foram analisadas após o processo de criopreservação, é esperado que tivessem uma queda na viabilidade. Estes resultados estão de acordo com o observado na literatura (DE ROSA et al., 2009; THIRUMALA et al., 2010). Diversos autores já vêm demonstrando que o processo de criopreservação pode influenciar na dinâmica intracelular, afetando a viabilidade das células. Fatores como o tempo de exposição ao DMSO, concentração de células, processo de congelamento (velocidade do congelamento, temperatura, composição do meio, etc.) e outros, podem influenciar na viabilidade das células (IRIODA et al., 2016).

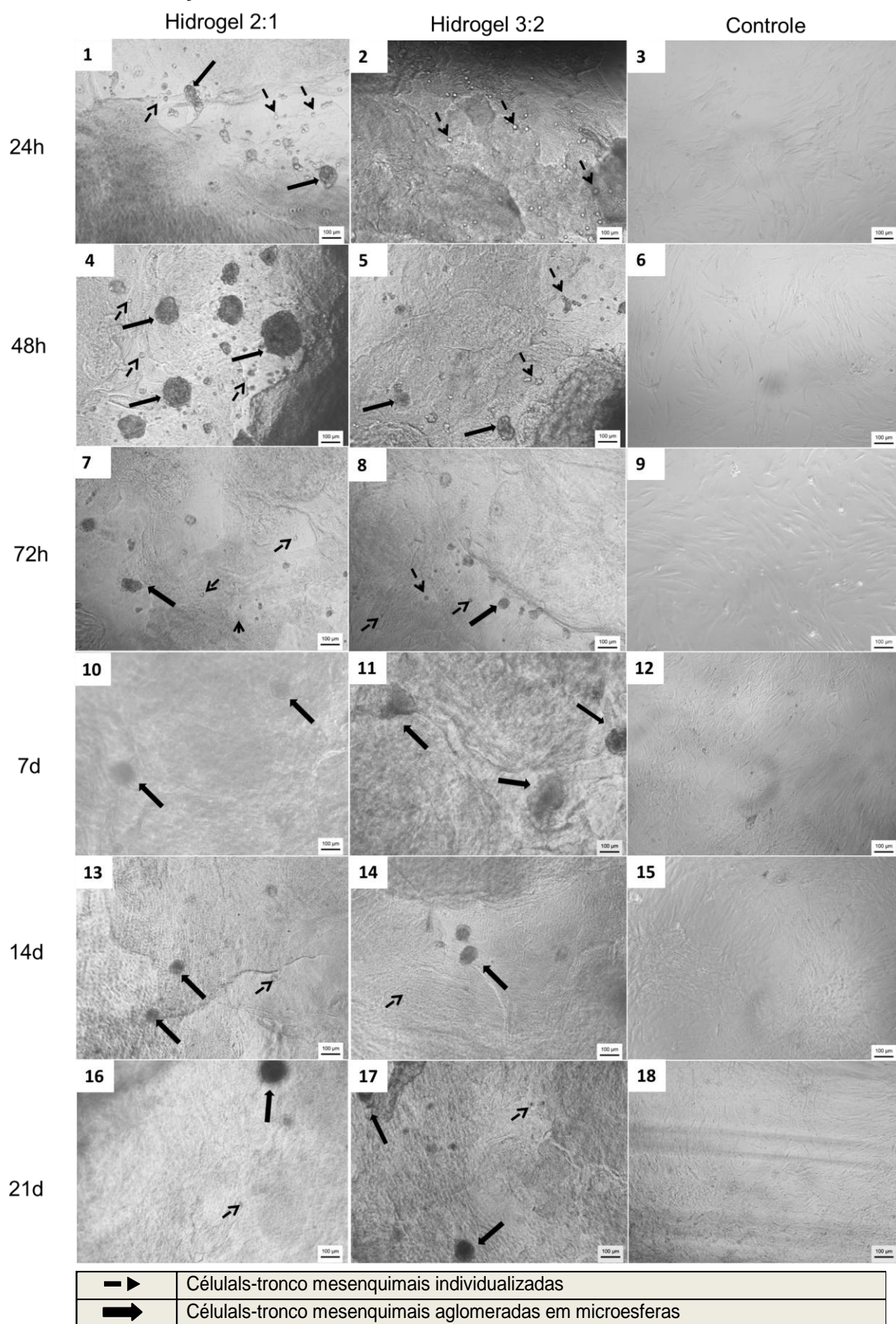
4.3.3 Resposta Biológica das Células-Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo (CTA) sobre os Hidrogéis HQ 2:1 e 3:2

As células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo foram cultivadas até a passagem P3 em substrato de poliestireno tratado, e na passagem seguinte foram aplicadas sobre os hidrogéis HQ. Os hidrogéis, nas proporções heteroramnana: quitosana 2:1 e 3:2, foram incubadas com as células e mantidos em cultivo. Diversas análises foram realizadas com o objetivo de verificar a viabilidade do biomaterial desenvolvido. As células foram cultivadas nos hidrogéis nos períodos de 24, 48, e 72 h; 7, 14, e 21 d e 3 meses. Durante este período, foi possível observar que as CTA eram incorporadas pelos hidrogéis e formavam agrupamentos entre elas, similares a microesferas celulares, em diferentes níveis de profundidade (Figura 39).

Nas primeiras 24 h de cultivo, foi possível observar que as células se mantiveram, preferencialmente, isoladas individualmente sobre os hidrogéis 2:1 e 3:2, como observado na Imagem 1 e 2, respectivamente. Após 48 h de cultivo, observou-se que as células apresentaram preferência em formar agrupados entre elas de tamanhos variados, e, consecutivamente, uma diminuição visual do número de células individualizadas até 21 dias de cultivo. As células mantidas em cultivo padrão e consideradas como controles (Fig. 40, Imagens 3, 6, 9, 12, 15 e 18) apresentaram aderência ao substrato e morfologia com aspecto estrelado nas primeiras 24 h de cultivo, e após o 7º dia de cultivo observou-se alta proliferação e

confluência das células (Figura 39).

FIGURA 39. FORMAÇÃO DE AGREGADOS CELULARES NOS HIDROGÉIS HQ 2:1 E 3:2



Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo cultivadas no hidrogel 2:1 e 3:2 durante os períodos de 24 h (1 e 2), 48 h (4 e 5), 72 h (7 e 8), 7 d (10 e 11), 14 d (13 e 14) e 21 d (16 e 17); CTA cultivadas em condições padrões de cultivo (controle) durante os períodos de 24h (3), 48h (6), 72h (9), 7d (12), 14d (15) e 21d (18). Imagens com aumento de 100x.

O mecanismo de formação de esferoides por células-tronco mesenquimais ainda é uma questão que precisa ser esclarecida. No entanto, estudos vêm demonstrando que a formação destes agregados celulares pode estar relacionada com a ausência de superfície de aderência, assim como com a falta de espaço para a proliferação ou a submissão de forças mecânicas (LI et al., 2010; BARANIAK et al., 2012; BARANIAK; MCDEVITT, 2012). As células cultivadas nestas estruturas tem demonstrado manter-se indiferenciadas, e concomitantemente, conservam sua multipotencialidade e a capacidade de secretar citocinas e quimiocinas (BARTOSH et al., 2010; LI et al., 2010; BHANG et al., 2011; ZHANG et al., 2012).

Em estudos com membranas de quitosana, observou-se resultados similares em que as CTA apresentaram a capacidade de formar agregados celulares a partir de 24 h de cultivo. Estes agregados celulares, também denominados esferoides, apresentaram-se na forma arredondada, com capacidade de proliferação e mantiveram-se indiferenciados (HUANG et al., 2011; CHENG et al., 2012). Os autores sugerem que a formação dos esferoides pode estar relacionada às condições não aderentes de cultivo, alto grau de confluência ou de privação de nutrientes/oxigênio.

Nos hidrogéis HQ 2:1 e 3:2 observou-se que a formação dos esferoides se dava de forma aleatória, sendo que em 48 h foi o tempo em que mais se observou estas estruturas. A partir de 72 h a quantidade de esferoides encontrados foi menor. Observou-se que durante os 21 dias de cultivo, os esferoides permaneceram com tamanhos similares, salvo em 72 h em que houve uma redução significativa entre eles (Tabela 11).

TABELA 11. DIÂMETRO DOS ESFEROIDES FORMADOS NOS HIDROGÉIS HQ 2:1 E 3:2 DURANTE 21 DIAS DE CULTIVO

Tamanho dos esferoides (µm)	Tempo de Cultivo					
	24h	48h	72h	7d	14d	21d
Média	129	128	66	115	131	134
Máx.	182	229	75	153	268	276
Mín.	97	71	51	87	92	83

^aPara os cálculos de tamanho dos esferoides foi considerada uma amostragem de n=6.

Em estudos realizados por Cheng e colaboradores (2012), os autores testaram diferentes concentrações de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo em membranas de quitosana, e observaram no 7º dia de cultivo que a densidade de $1,25 \times 10^4$ células/cm² proporcionava a formação de esferoides com diâmetros médios de 136 µm. Em densidades menores de células ($1,5 \times 10^3$) não se observou a formação de esferoides, enquanto que em densidades maiores (5×10^4) os esferoides formados possuíam diâmetros próximos a 200 µm. Em hidrogéis de metil-celulose observou-se que densidades de 1×10^4 eram suficientes para a formação de esferoides com diâmetros de 200 µm, e em alta densidade (2×10^5) chegaram a medir 800 µm (LEE et al., 2009). Além da densidade de células/cm², pressupõe-se que o meio em que elas são dispostas também influencia no tamanho dos esferoides formados.

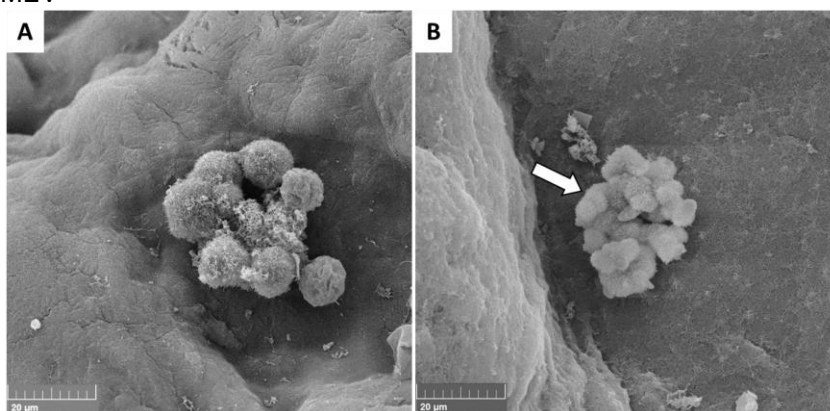
Em alguns estudos, têm-se demonstrado que a capacidade de difusão do oxigênio em estruturas celulares muito densas é reduzida consideravelmente em distâncias além de 200 µm (CURCIO et al., 2007; LEE et al., 2009). Em agregados celulares formados a partir de hepatócitos, observa-se uma redução na viabilidade celular de aproximadamente 30% (CURCIO et al., 2007). No entanto, para as células-tronco mesenquimais, têm-se demonstrado que quando em hipóxia a viabilidade das mesmas não é afetada (ZHU et al., 2006). Nos estudos realizados por Rosova e colaboradores (2008), observou-se que quando as CTM eram mantidas nas condições de cultivo entre 1 a 3% de oxigênio, as células apresentaram viáveis, com capacidade para proliferação e migração. No mesmo estudo, foi observado que as células mantidas em hipóxia foram mais eficazes na migração e reparação inicial de isquemia muscular, quando comparados com células mantidas em cultivo normal.

Nos nichos naturais em que as CTM são encontradas, como na medula

óssea, a concentração de oxigênio varia entre 1 a 2% (CIPOLLESCHI et al., 1993). Em muitos estudos, a capacidade das células-tronco mesenquimais em manter-se indiferenciadas por longos períodos tem sido correlacionada com as condições hipóxicas em que são encontradas (CSETE, 2005; EZASHI et al., 2005; KUROSAWA et al., 2006; GRAYSON et al., 2007). A interação célula-célula até formar os agregados entre si pode ser uma forma de comunicação das células diante as condições desfavoráveis do meio em que se encontram, e como resposta biológica, formam os esferóides com o intuito de criar um meio mais propício para a sua viabilidade e proliferação.

Nas análises por MEV (descrito com mais detalhe na seção 4.3.3.2, pág. 159), foi possível observar a formação dessas estruturas nas primeiras 24 e 48 h de cultivo (Figura 40). Na Imagem A, observa-se uma interação inicial entre as células, formando agregados celulares esparsos. Já na Imagem B, verifica-se que algumas células presentes no esferoide se encontram em processo de mitose, e o esferoide se apresenta de forma mais compacta. A partir de 72 h de cultivo, não foi observado a presença dessas estruturas por análises de MEV. Em estudos *in vitro*, a formação dos esferóides tem sido observada a partir de três eventos cruciais: primeiramente, as células tem o contato inicial célula-célula, seguido do acúmulo de caderinas e finalmente a compactação dos agregados (LIN et al., 2005; LIN; CHANG, 2008).

FIGURA 40. FORMAÇÃO DOS ESFERÓIDES NOS HIDROGÉIS HQ 2:1 OBSERVADOS POR ANÁLISES DE MEV



⇒	Células-tronco mesenquimais em processo de mitose
---	---

Esferóides formados em 24 h (A) e 48 h (B) de cultivo no hidrogel 2:1. Aumento de 3000x.

Em estudos com alginato, Baraniak e colaboradores (2012) observaram a capacidade de formação e integração do alginato nos esferoides formados a partir das CTM. Observou-se que os esferoides contendo alginato apresentavam melhor compactação quando comparados com os formados somente de células, não havendo alterações na morfologia celular e nem na organização multicelular destas estruturas. Visto que a partir de 72 h de cultivo não foi encontrado nenhuma evidência por MEV de agrupamentos celulares na superfície dos hidrogéis HQ, e observa-se que muitas células estão sendo adsorvidas, pressupõe-se que os esferoides têm preferência por compactação integrada nos hidrogéis heteroramnana:quitosana.

Uma das grandes dificuldades encontradas em estudos clínicos utilizando as CTM esta relacionada com a quantidade de células que chegam e permanecem no sítio de injúria. Em aplicação intravenosa, para que a quantidade de interesse chegue ao destino, a concentração de células necessária acaba sendo muito grande ($1-5 \times 10^6$ células/kg do paciente), tornando-se um procedimento inviável devido ao alto custo, mas principalmente, devido aos riscos que envolvem as mutações geradas durante a proliferação *in vitro*, assim como, a formação de embolia pulmonar ou infarto após a aplicação das células. No caso de uma aplicação *in situ*, o procedimento é invasivo, sendo necessário metodologias infusivas precisas (WAGNER et al., 2009). Neste sentido, o uso dos agregados celulares em estudos clínicos têm recebido destaque, e vêm demonstrado maior eficiência na capacidade regenerativa quando comparado com os tratamentos somente com células individualizadas (WANG et al., 2009; BARTOSH et al., 2010; LI et al., 2010; ZHANG et al., 2012).

Outra questão que deve ser tomada em consideração é a capacidade desses esferoides em se tornar tumores. Estudos vêm demonstrando que a partir do momento em que as células no interior dos esferoides começam a sofrer apoptose ou apresentam indícios do processo de *anoikis*, estes agregados celulares estão sujeitos a indução e formação de tumores (LIN; CHANG, 2008). Neste aspecto, são necessários maiores evidências para demonstrar a interfase em que os esferoides podem ser aplicados à engenharia de tecidos ou como modelo para o tratamento de câncer.

A preferência por baixas concentrações de oxigênio, somado as características ultraestruturais (Figura 34 e 35, pág. 133 e 137) e a alta capacidade

de absorção de fluídos (Gráfico 1, pág. 111) dos hidrogéis testados, podem ser fatores influentes para a formação de esferoides integrados. Visto que os esferoides tem demonstrado ser mais eficientes em aplicações terapêuticas, estudos dos agregados celulares formados, assim como testes *in vivo* devem ser levados em consideração.

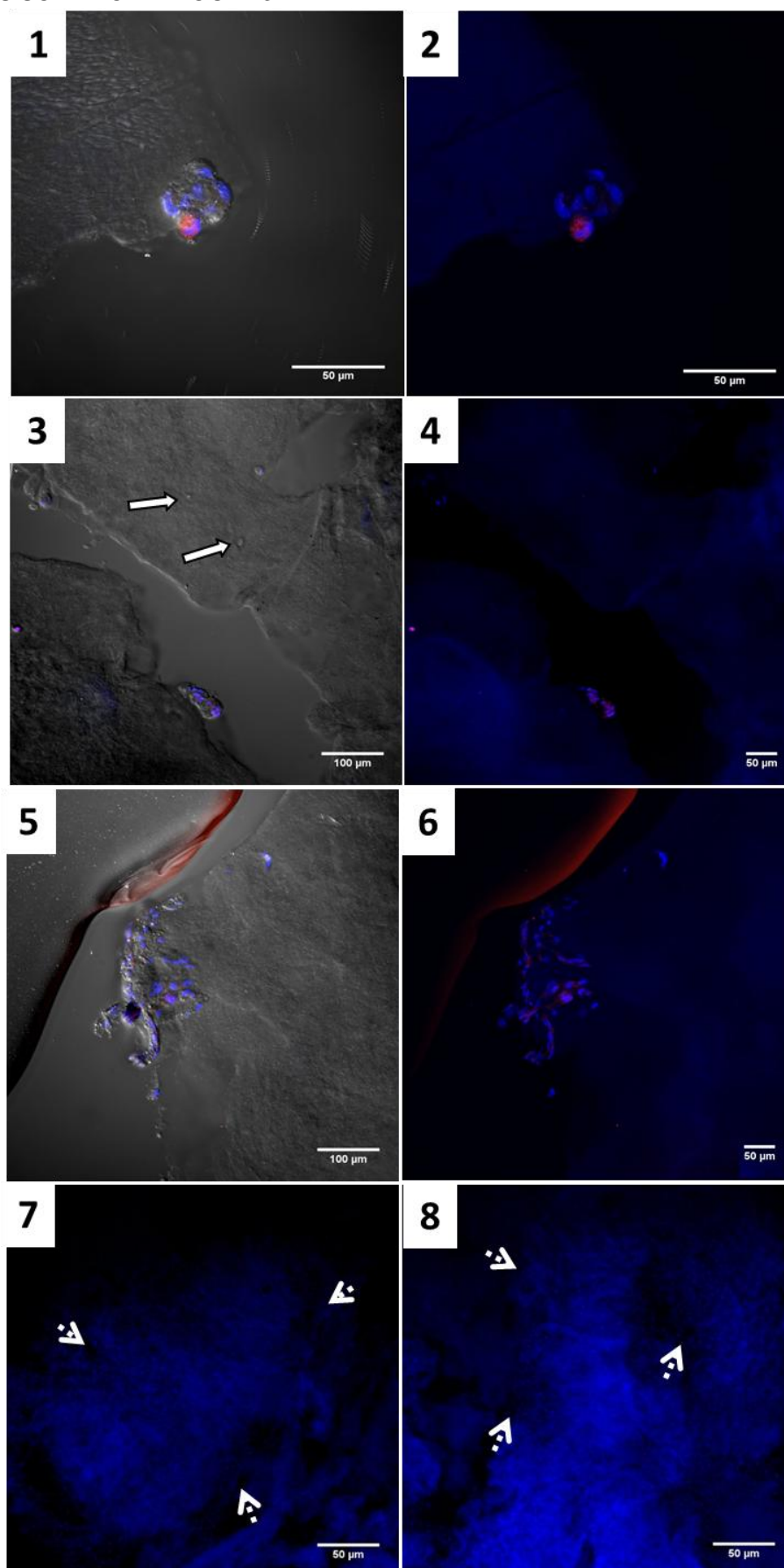
4.3.3.1 Viabilidade Celular



Um dos requisitos mais importante para que um biomaterial seja aplicável na medicina regenerativa é a viabilidade quando *in vivo*. As primeiras evidências das respostas biológicas geradas pelo biomaterial testado podem ser realizadas através de testes *in vitro*, que podem fornecer informações iniciais valiosas. Para verificar a viabilidade das CTA nos hidrogéis HQ, foi necessário realizar tentativas por diferentes métodos, devido a natureza destes hidrogéis. A primeira tentativa foi utilizando o método colorimétrico por cristal violeta (SAOTOME et al., 1989), no entanto, não foram observadas diferenças significativas entre o controle (somente os hidrogéis) e os hidrogéis com células.

Entre as análises colorimétricas testadas, observou-se que os hidrogéis retinham grandes concentrações do corante reagente. Neste ponto é importante lembrar que os hidrogéis 2:1 e 3:2 demonstraram alta capacidade para absorver e reter fluídos em sua estrutura. Esta característica pode ser um fator determinante nas análises colorimétricas, visto que o corante é altamente absorvido pelos hidrogéis, não sendo possível detectar diferenças significativas de viabilidade por este método.

Outro método de viabilidade testado, também sem sucesso, foi por MTT (MOSMANN, 1983). Pressupõe que a ausência da formação dos cristais de formazan, produto da reação entre a succinil desidrogenase e o sal de tetrazólio, foi devido a impossibilidade do reagente atingir as mitocôndrias celulares. Esta característica também foi evidenciada por análises de imunofluorescência, utilizando o corante DAPI para células viáveis e o iodeto de propídio para células mortas. Somente as células superficiais ou aquelas que se encontravam em agregados celulares incorporaram os corantes, como demonstrado na Figura 41.

FIGURA 41. ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL DAS CTA CULTIVADAS SOBRE O HIDROGEL 3:2



	Células individualizadas sem a marcação com DAPI
	Núcleo das células marcadas com DAPI

Em azul são os núcleos das células marcadas com DAPI e em vermelho com iodeto de propídio. As Imagens 1 e 2, representam células mantidas em cultura pelo tempo de 24 horas e no aumento de 60x. As Imagens 3 e 4, representam células mantidas em cultura pelo tempo de 48 horas e no aumento de 20x. As Imagens 5 e 6, representam células mantidas em cultura pelo tempo de 72 horas e no aumento de 20x. As Imagens 7 e 8, representam células mantidas em cultura pelo tempo de 21 dias e no aumento de 40x. As Imagens 1, 3 e 5 representam a sobreposição de imagens de Contraste de Interferência Diferencial (DIC) e fluorescência.

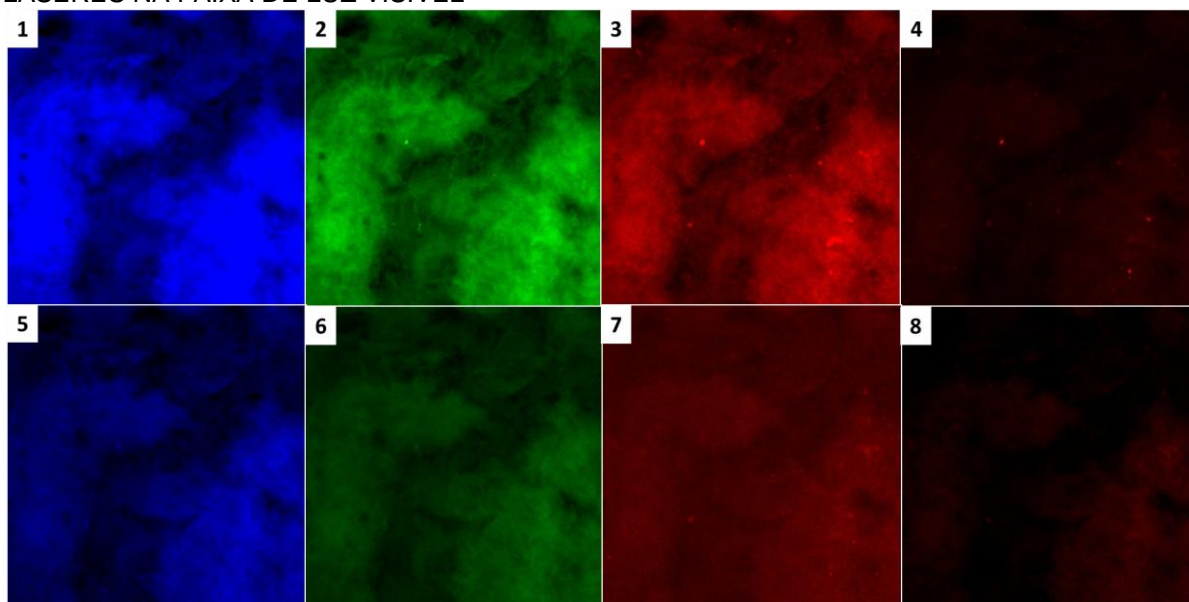
Na Imagem 3, é possível observar com mais detalhe a presença de algumas células, que à primeira vista, parecem estar na superfície da membrana. No entanto, na Imagem 4, verifica-se que estas não demonstraram incorporação do corante quando analisados por fluorescência. Deste modo, sugere-se que as células estão em planos diferentes, indicando a adsorção das células nos hidrogéis HQ. Para demonstrar a presença das células nos hidrogéis, foi realizado um teste utilizando a saponina, com o intuito de abrir a malha do hidrogel HQ e permitir que os anticorpos e corantes pudessem ter acesso para interagir com as células. A saponina foi adicionada a todas as etapas de lavagem com PBS (concentração de 0,01%) no preparo para as reações de imunomarcação, e observou-se que a marcação do núcleo das células foi realizada com sucesso em diferentes dimensões do plano Z, demonstrando que as células foram adsorvidas pelo hidrogel. Resultados comprobatórios podem ser observados nas Imagens 7 e 8, onde pode ser constatado a marcação do núcleo da célula pelo corante fluorescente DAPI, sendo possível verificar vários núcleos celulares por toda a extensão e profundidade da malha do hidrogel HQ 3:2.

A saponina é o nome genérico de um grupo de glicosídeos de esteroides ou triterpenóides, produzidos pelo metabolismo secundário de plantas. É uma molécula complexa e que apresenta variações na sua estrutura conforme a sua natureza. Tem sido aplicada em diversas áreas, entre eles na capacidade de permeabilização da membrana citoplasmática (FRANCIS et al., 2002). Deste modo, a viabilidade das células não pode ser confirmada pelo corante DAPI, visto que a membrana das células pode ter sofrido microaberturas, permitindo a entrada do corante por difusão.

Nos estudos realizados por Baraniak e colaboradores (2012), também houve dificuldades para analisar a viabilidade das células nos esferoides formados em alginato. A incorporação do fluoróforo Alexa-488 foi observada em todo o esferoide, não sendo possível detectar marcações específicas. Nos hidrogéis HQ observou-se

que quando estes foram excitados pelos respectivos lasers verde (532 nm), azul (460 nm) e vermelho (585 nm), os hidrogéis emitiam fluorescência em todos os comprimentos de onda analisados (Figura 42). Somente o laser no comprimento de onda do vermelho longo 640 nm foi o que apresentou menor emissão de fluorescência.

FIGURA 42. AUTOFLUORESCÊNCIA EMITIDA PELOS HIDROGÉIS HQ QUANDO SUBMETIDOS À LASERES NA FAIXA DE LUZ VÍSEL



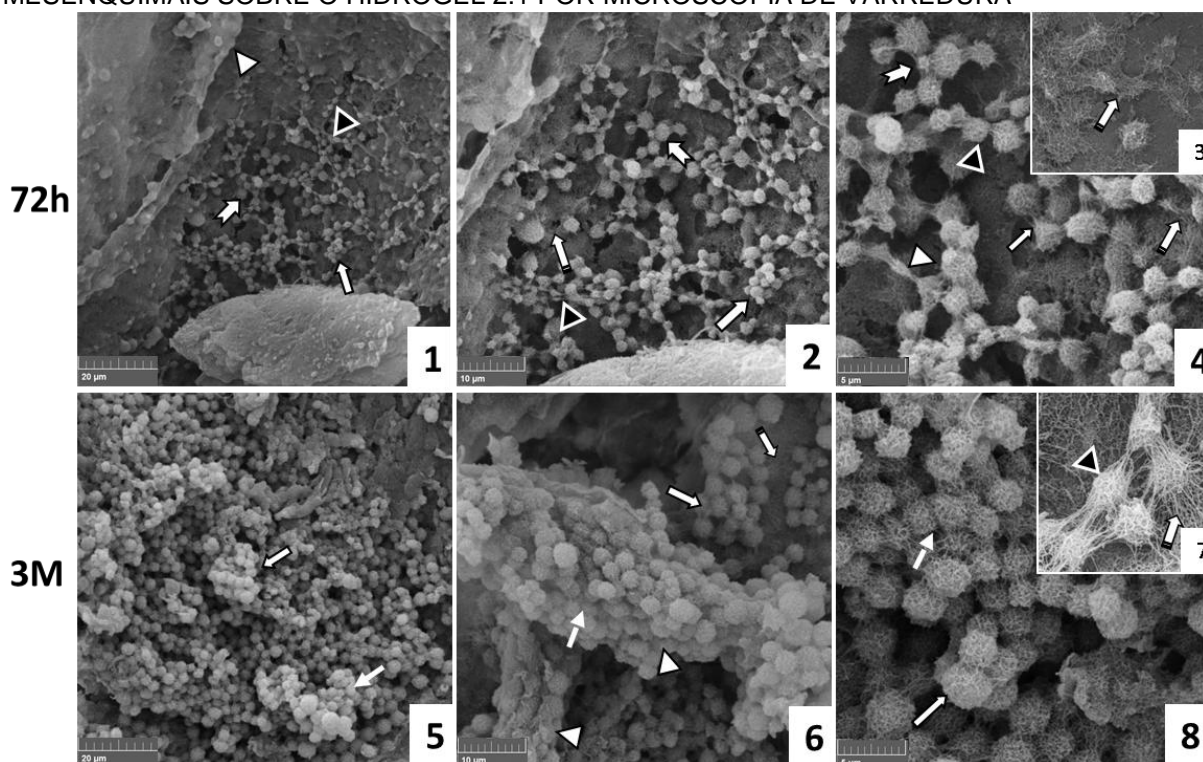
Emissão máxima emitida pelos lasers azul (1), verde (2), vermelho (3) e vermelho longo (4) e emissão mínima emitida pelos mesmos lasers (5, 6, 7 e 8, respectivamente). Todas as Imagens estão na magnitude de 20x.

A autofluorescência dos hidrogéis HQ foi um fator que dificultou as análises de imunofluorescência, não sendo possível denotar regiões específicas consideradas como esferoides. Os agregados celulares foram observados somente nas primeiras horas, visto que estes apresentam alta concentração de células compactas entre si. Pressupõe-se que além da dificuldade em serem adsorvidas pelo hidrogel devido ao tamanho, quando integradas, geram alta fluorescência juntamente com a emitida pelo hidrogel, não sendo possível a detecção destas estruturas.

4.3.3.2 Análise Morfológica e Ultraestrutural das Células-Tronco Mesenquimais sobre os Hidrogéis HQ 2:1 e 3:2 Utilizando Microscopia de Varredura (MEV)

Através das análises de microscopia de varredura é possível observar a resposta biológica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo quando cultivadas sobre os hidrogéis HQ 2:1 e 3:2 (Figuras 43 e 44, respectivamente). Na Figura 43, é possível observar as células-tronco mesenquimais de tecido adiposo cultivadas no hidrogel HQ 2:1. Pode-se observar nas Imagens 1, 2, 3 e 4 as células plaqueadas por 72 h sobre o hidrogel HQ 2:1, apresentando formas arredondadas de diferentes diâmetros e aderidas sobre o hidrogel. Verifica-se que estas células tendem a manter a adesão intercelular na forma de agregados celulares ou cordões de células. Os cordões de células podem ser observados em evidência nas Imagens 2, 4 e 7, e os agregados na forma de cordões nas Imagens 4 e 6, sendo mais evidentes nesta última, apresentando um maior número de células.

FIGURA 43. ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SOBRE O HIDROGEL 2:1 POR MICROSCOPIA DE VARREDURA



	Morfologia arredondada, com diferentes diâmetro
	Adesão intercelular na forma de agregados
	Cordões de células
	Agregados de células na forma de cordões
	Projeções membranares ou matriz fibrilar produzidos pelas células
	Interação de células justapostas e sobrepostas

As Imagens 1, 2, 3, e 4 representam células mantidas em cultura pelo tempo de 72 horas. As Imagens 5, 6, 7 e 8 representam células mantidas em cultura pelo tempo de 3 meses. As Imagens 1 e 5 estão na magnitude de 3000x. As Imagens 2 e 6 estão na magnitude de 5000x. As Imagens 3, 4, 7 e 8 estão na magnitude de 10000x.

As Imagens 5, 6, 7 e 8 evidenciam células mantidas sobre o hidrogel por 3 meses. Em menor magnitude (Imagem 5), verifica-se um maior número de células, estando estas mais justapostas e formando agregados empilhados umas sobre as outras. Na Imagem 5 e 6, observa-se uma nítida coesão entre as células, mantendo uma arquitetura de sobreposição e interação celular. Em maior magnitude (Imagem 7), é possível observar projeções membranares ou uma matriz fibrilar secretada pelas células, apresentando-se em menor quantidade, quando comparados ao hidrogel HQ 3:2, como será descrito a seguir.

No hidrogel HQ 3:2 (Figura 44) observa-se nas Imagens 1, 2 e 3 as células plaqueadas por 24 h sobre o respectivo hidrogel. Verifica-se que estas células apresentam morfologia arredondada, e estão aderidas por sobre a matriz regular e homogênea deste hidrogel. As células apresentam diâmetros semelhantes em sua grande maioria, sendo que poucas e esparsas células possui menor diâmetro. É possível observar material particulado e esparsos por entre as mesmas, e em maior magnitude (Imagem 3 e 4), observa-se que estas células apresentam projeções membranares por sobre estas ou em contato direto com o substrato do hidrogel, semelhante a filopódios.

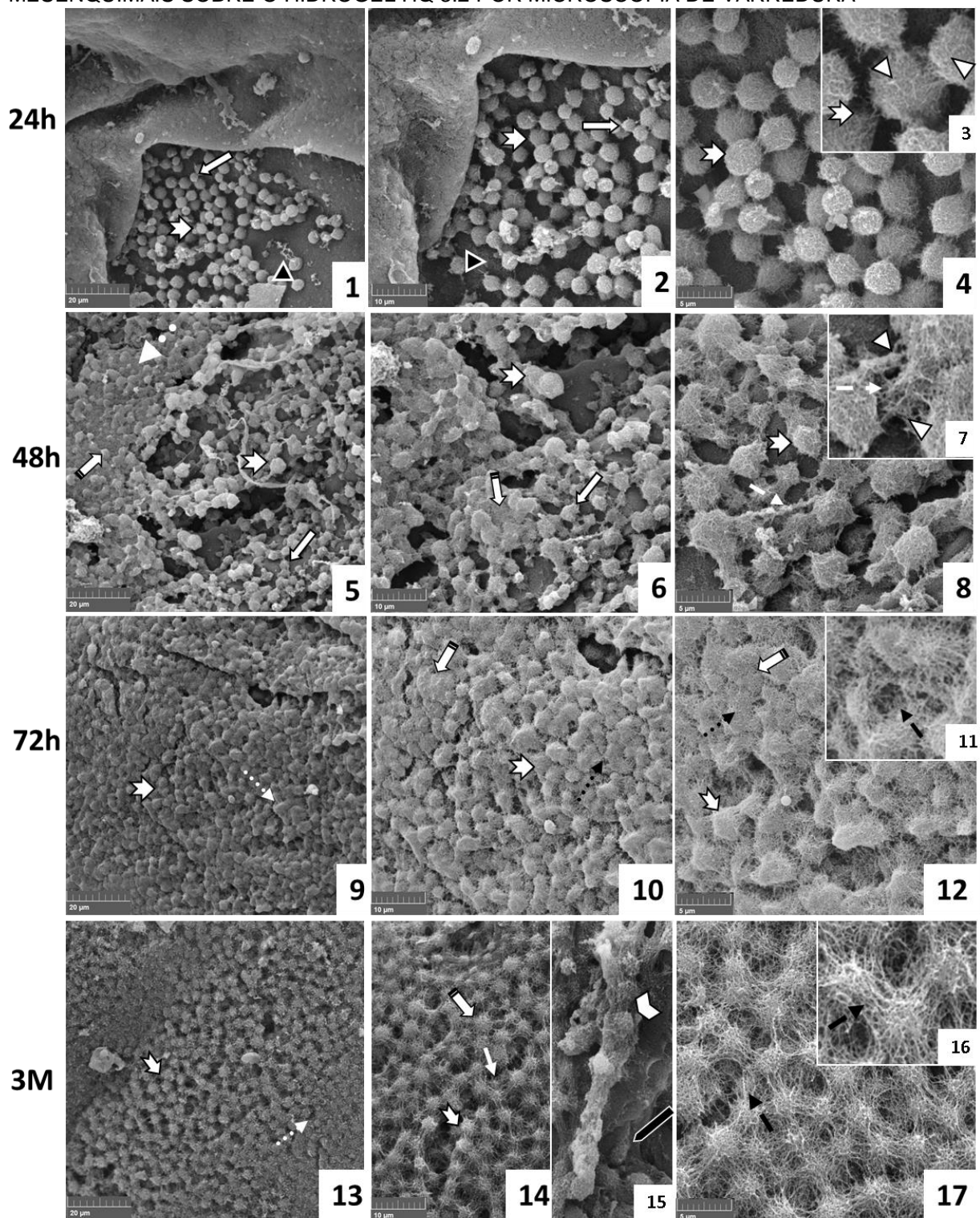
Nas Imagens 5, 6 e 7 observa-se as células plaqueadas por 48 h em cultivo celular sobre o hidrogel 3:2. Na Imagem 5, em menor magnitude, verifica-se um maior número de células, estando estas mais justapostas e formando agregados empilhados umas sobre as outras. Em maior magnitude (Imagem 6 e 7), observa-se que sobre as células há material característico que as recobrem e as interconectam, material formado por rede fibrilar. Verifica-se que estas estão aderidas sobre o hidrogel, bem como, por entre esta malha fibrilar, formam agregados ou conexões celulares. As células mantidas sobre o hidrogel por 72 h no cultivo celular (Imagens 9, 10 e 11) observa-se que estas formaram uma nítida monocamada com justaposição entre elas. As células mantiveram a forma arredondada, verificando-se um aumento nítido da produção de rede fibrilar que recobre as células e as interconectam (Imagem 11 e 12), semelhante a matriz extracelular.










As Imagens 13, 14, 15, 16 e 17 evidenciam células mantidas sobre o hidrogel por 3 meses. É possível observar que as células estão formando uma monocamada e estão imersas dentro de um arcabouço fibrilar (Imagem 14), podendo se observar, em maior magnitude (Imagem 16 e 17), que esta matriz apresenta um padrão característico homogêneo organizacional do entrelaçamento destas fibras, o qual recobre todas as células e que estão imersas dentro destes arcabouços, sendo muito similares à arranjos de matriz extracelular. A Imagem 15 evidência áreas do hidrogel onde as células estão formando cordões de agregados celulares justapostos, bem como estão permeando a matriz do hidrogel.

Em estudos com membranas de quitosana com diferentes porcentagens de acetilação, foram observadas respostas biológicas similares das células-tronco mesenquimais da medula óssea (BM-MSC) quando submetidos ao material. Foi observado que as membranas com porcentagem acima de 13% de acetilação da quitosana, apresentavam menor adsorção da fibronectina, uma das proteínas da matriz extracelular responsável pela interação célula-matriz, além das células não demonstrarem capacidade para o espraiamento e proliferação sobre a superfície do material, permanecendo no formato esferoide, porém com a capacidade para formar pequenos agregados celulares. Em contrapartida, a membrana contendo quitosana 4% acetilada, foi o que apresentou a melhor capacidade de adsorção da fibronectina, e consecutivamente, a aderência e espraiamento das BM-MSC sobre o material (AMARAL et al., 2005).

A partir das análises de microscopia eletrônica de varredura das CTA sobre o hidrogel de heteroramnana:quitosana, fica evidente a partir da comparação entre as Imagens do hidrogel HQ 2:1 com o hidrogel HQ 3:2, que há um estímulo diferente dos respectivos substratos para a mesma linhagem celular. De forma divergente ao estímulo induzido pelo hidrogel HQ 3:2, o hidrogel HQ 2:1 não induz de forma evidente a biossíntese de proteínas da matriz, mas sim estimula a adesão intercelular formando grandes agregados de células justapostas ou formando organizações de células enfileiradas. Ambos os hidrogéis proporcionam proliferação celular, sendo que o hidrogel HQ 3:2 demonstrou, quando mantidas por maior período de tempo em cultivo celular, a capacidade de formar uma monocamada estimulando a biossíntese e organização densa de uma matriz extracelular. Foram identificadas algumas das moléculas características desta matriz extracelular, secretada pelas CTA, como será descrito a seguir.

FIGURA 44. ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SOBRE O HIDROGEL HQ 3:2 POR MICROSCOPIA DE VARREDURA



	Células com morfologia arredondada e diâmetros semelhantes, aderidas sobre o hidrogel
	Células de menor diâmetro
	Material particulado
	Projeções membranares sobre e em contato com o substrato
	Agregação e justaposição celular
	Rede fibrilar
	Monocamada justaposta
	Cordões de agregados celulares justapostos
	Células permeando a matriz do hidrogel

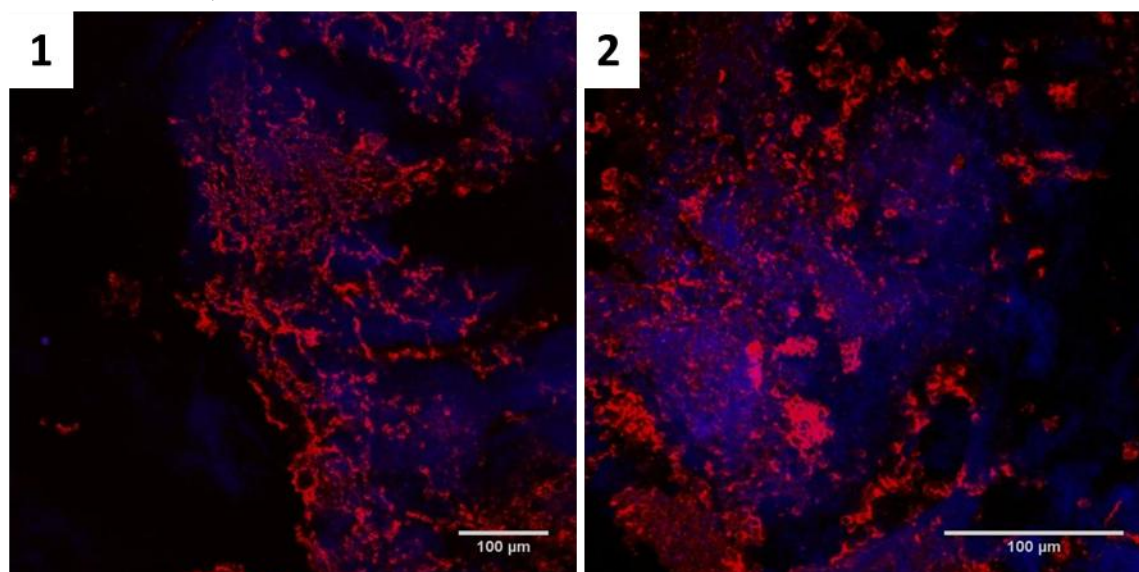
As Imagens 1, 2, 3, e 4 representam células mantidas em cultura pelo tempo de 24 horas. As Imagens 5, 6, 7 e 8, representam células mantidas em cultura pelo tempo de 48 horas. As Imagens 9, 10, 11 e 12 representam células mantidas em cultura pelo tempo de 72 horas. As Imagens 13, 14, 15, 16 e 17 representam células mantidas em cultura pelo tempo de 3 meses. As Imagens 1, 5, 9, e 13 estão na magnitude de 3000x. As Imagens 2, 6, 10, 14 e 15 estão na magnitude de 5000x. As Imagens 4, 8, 12 e 17 estão na magnitude de 10000x. As Imagens 3, 7, 11 e 16 estão na magnitude de 20000x.

4.3.3.3 Caracterização da Matriz Extracelular (MEC)

Através das análises mais detalhadas de MEV foi possível observar que durante os dias analisados, as células produziram quantidades consideráveis de material fibroso semelhante à proteínas da matriz extracelular, principalmente no hidrogel HQ 3:2 (Figura 44). Deste modo, foram realizados estudos para caracterizar esta matriz, utilizando anticorpos específicos contra fibronectina pela técnica de imunomarcacão e análise por microscopia confocal de fluorescência por varredura laser.

Na Figura 45, é possível observar através da técnica de imunofluorescência, intensa marcação para uma das proteínas características de matriz extracelular, a fibronectina. Esta proteína é uma glicoproteína de alto peso molecular da matriz extracelular que pode ser encontrada fora ou na superfície das células, no plasma sanguíneo e em outros fluídos corporais (HYNES, 1990). A fibronectina tem papel fundamental na integridade da estrutura da MEC, podendo se ligar a outros componentes da matriz, como colágeno, fibrinogênio e glicosaminoglicanas, assim como, fornecer propriedades funcionais para tecidos vivos, contribuindo na adesão, proliferação, migração e diferenciação celular (HYNES, 1990; STOFFELS et al., 2013). Essas características tem papel essencial em diversas atividades celulares correlacionadas, tais como, embriogênese (DOWNIE; NEWMAN, 1995), metástase (ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2000) e no processo de cicatrização de feridas (CLARK, 1990).

FIGURA 45. ANÁLISE DA MATRIZ EXTRACELULAR FORMADA PELAS CTA CULTIVADAS SOBRE O HIDROGEL HQ 3:2



CTA cultivadas no hidrogel 3:2 durante 21 dias. Em azul o núcleo das células marcadas por DAPI e em vermelho a matriz marcada por anti-fibronectina. A Imagem 1 esta na magnitude de 20x, e a Imagem 2 esta na magnitude de 40x.

Em estudos realizados por Robinson e colaboradores (2004), foi evidenciado a partir de plasmídeos quiméricos expressando as proteínas integrinas $\alpha 5 \beta 1$, que além da capacidade em produzir fibronectina, as integrinas demonstraram estar intimamente relacionadas com o processo de formação de esferoides. Nesse estudo, também foi observado que a fibronectina tem papel fundamental na agregação, compactação e coesão entre as células. Lin e colaboradores (2005) também evidenciaram em linhagens celulares de hepatoma humano que a fibronectina esta relacionada com o processo de formação de agregados celulares. Estas características são essenciais para estudos da formação de estruturas celulares em 3D e para o entendimento de como ocorre a compactação e remodelamento dos tecidos.

Resultados similares foram obtidos nos estudos realizados por Cheng e colaboradores (2012) onde observou-se a produção de esferoides celulares a partir de CTA cultivadas em filmes de quitosana. Também se observou que essas células foram capazes de produzir proteínas da matriz extracelular fibronectina e laminina, e manter-se indiferenciadas em cultivo padrão, mas com capacidade para diferenciar-se em células neuronais e hepatócitos quando induzidas. Os esferoides formados neste biofilme foram injetados via intramuscular, e demonstraram a capacidade de

manter-se no local de interesse, quando comparados com células dissociadas a partir de cultivo em monocamada 2D.

O hidrogel HQ 3:2 de heteroramnana:quitosana proporcionou para as CTA um suporte capaz de induzir a produção de uma densa matriz extracelular, constituída em parte por fibronectina. O aumento da concentração localizada desta proteína permite a formação de fibrilas, que são matrizes compostas por multímeros de alto peso molecular de fibronectina, e que são resistentes e insolúveis a detergentes (MORLA; RUOSLAHTI, 1992; WIERZBICKA-PATYNOWSKI, 2003). Na literatura, muitos estudos relacionados ao desenvolvimento de biomateriais (*scaffold*, membranas, hidrogéis) utilizam esta proteína, assim como outras biomoléculas que integram a MEC (colágeno, vitronectina, e outras), para auxiliar na adesão e proliferação das células sobre os substratos (LEVENBERG et al., 2003; LIN et al., 2005; LIN; CHANG, 2008).

A biossíntese de uma matriz de fibronectina secretada e organizada com padrões característicos para esta molécula, permitem concluir que o arranjo fibrilar observado por MEV, ou pelo menos uma parte desta, é composta pela matriz de fibronectina secretada e organizada pelas CTA crescendo no hidrogel polissacarídico constituído de heteroramnana sulfatada isolada de macroalgas e quitosana.

Em vista destas características, os hidrogéis HQ podem constituir um potencial biomaterial para aplicações nas áreas biomédica, farmacêutica e cosmética. A capacidade das células produzirem uma densa matriz extracelular permite aplicações voltadas para regeneração tecidual, remodelamento da matriz extracelular, assim como rejuvenescimento da pele. A capacidade em formar esferoides é outra característica que permite aplicações dos hidrogéis HQ como carreadores de células e como estruturas tridimensionais para o cultivo de células, simulando biorreatores. O hidrogel HQ demonstrou características singulares para diversas aplicações na área biomédica, e devem ser levadas em consideração através de novos estudos para identificar outras possíveis proteínas constituintes da matriz, bem como para avaliar seu potencial *in vivo*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento deste trabalho permitiu demonstrar a formação de hidrogéis a partir da complexação polieletrólito entre os polissacarídeos heteroramnana e quitosana (Hidrogéis HQ). A partir das diferentes proporções testadas, observou-se que os hidrogéis nas proporções H:Q 2:1 e 3:2 foram os que apresentaram o melhor rendimento final. Também observou-se que os hidrogéis formados em proporções de 4 ou 5 vezes superior de um polissacarídeo em relação ao outro, tem baixo rendimento, além dos hidrogéis formados apresentarem baixa estabilidade quando submetidos a reidratação em água ou tampão fosfato. Os hidrogéis HQ apresentaram alta capacidade em absorver fluídos e manter a estrutura tridimensional hidratada e intumescida. Esta característica dificultou a aplicação de análises colorimétricas, no entanto, pode ter proporcionado a adsorção das células nos hidrogéis. Outra característica dos hidrogéis HQ foi a autofluorescência emitida quando submetido a lasers na faixa do espectro visível.

A caracterização química por FTIR e RAMAN demonstrou que os hidrogéis formados por diferentes proporções de heteroramnana e quitosana apresentaram similaridade na sua composição química, sendo evidenciado sinais específicos dos dois polissacarídeos, além de sinais do ácido bórico. A partir dos resultados obtidos sugere-se que a formação dos hidrogéis HQ ocorre de forma aleatória entre os grupamentos livres (amino, carboxila, hidroxila e sulfato) presentes nos polissacarídeos, e simultaneamente, o ácido bórico também colabora no processo de complexação polieletrólítica para a formação dos hidrogéis, podendo estas ser através de ligações iônicas ou pontes de hidrogênio.

Nas análises ultraestruturais por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível observar nos hidrogéis HQ a formação de duas estruturas morfologicamente distintas, sendo uma estrutura lisa homogênea que foi associada ao polissacarídeo quitosana, enquanto que, a outra estrutura com agregados porosos foi associada ao polissacarídeo heteroramnana. Nas análises por microscopia de força atômica foi possível observar que os hidrogéis HQ apresentam uma superfície altamente rugosa.

Nas análises biológicas utilizando as células-tronco mesenquimais de tecido adiposo sobre os hidrogéis 2:1 e 3:2 foi possível observar que as células mantiveram-se no formato esférico durante o período de 24 h até 3 meses em cultivo

in vitro, sendo que nas primeiras 72 h de cultivo observou-se que as células apresentaram preferência em formar agregados celulares. A partir das análises por MEV verificou-se que o hidrogel 3:2 demonstrou ser um substrato mais compatível quando comparado ao hidrogel 2:1, apresentando um aumento na quantidade de células durante o cultivo e uma alta produção de matriz extracelular.

Por técnicas de imunomarcacão e análise em microscopia confocal de fluorescência por varredura laser foi evidenciado que a matriz extracelular produzida pelas células-tronco mesenquimais de tecido adiposo é composta pela proteína de matriz fibronectina. Também foi observado que as células foram adsorvidas no hidrogel, podendo ser encontradas em diferentes planos de profundidade. Os hidrogéis HQ apresentaram características relevantes para aplicações na engenharia de tecidos para o remodelamento de matriz extracelular e como carreadores de células.

6 CONCLUSÕES

- Foi possível a formação de hidrogéis a partir da complexação polieletrólito entre os polissacarídeos heteroramnana sulfatada e quitosana (H:Q);
- As proporções H:Q 2:1 e 3:2 apresentaram os hidrogéis com as melhores características;
- O ambiente 3D dos hidrogéis permitiu a manutenção da morfologia das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTA) por pelo menos 3 meses em cultivo;
- Os hidrogéis induziram a formação de matriz extracelular produzida pelas CTA. A proteína fibronectina foi identificada como um dos componentes desta matriz;
- As células foram adsorvidas no hidrogel em diferentes planos de profundidade, característica essencial para carreadores de células.
- Foi possível produzir um biomaterial com potencial biotecnológico para aplicação na Medicina Regenerativa

6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O hidrogel desenvolvido a partir da heteroramnana e quitosana demonstrou resultados promissores para a engenharia de tecidos, no entanto, mais estudos biológicos devem ser levados em conta para determinar a sua real aplicação na medicina regenerativa. Fatores como a viabilidade, capacidade proliferativa e manutenção da indiferenciação ou indução da diferenciação dessas células nos hidrogéis HQ, devem ser exploradas mais à fundo. Estudos *in vivo* também devem ser levados em consideração, para poder avaliar a resposta biológica do sistema imunológico frente a implantação de CTA e hidrogel HQ.

Além da aplicabilidade do hidrogel HQ para o remodelamento de matriz extracelular e substrato/carreador de células-tronco mesenquimais, outras importantes funções poderão ser avaliadas, tais como carreador de drogas, membranas para barreiras imunológicas, biosensores, entre outros.

REFERÊNCIAS

- ALBA, S. Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 13, n. 1, p. 40–44, 1991.
- AINOUZ, I. L. et al. Agglutination of Enzyme Treated Erythrocytes by Brazilian Marine Algal Extracts. **Botanica Marina**, v. 35, n. 6, p. 475–479, 1992.
- ALBUQUERQUE, I. R. L.; QUEIROZ, K. C. S.; ALVES, L. G.; SANTOS, E. A.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n.2, p. 167–171, 2004.
- ALVES, A.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. **A Bottom Up Approach To Establish Ulva As a Biomaterial**. Apresentado na Semana de Engenharia 2010, Guimarães, 2010. Disponível em: <http://www3.dsi.uminho.pt/seeum2010/cd/abstracts/2000_2_corrigido.pdf>. Acesso em: 13 de Setembro de 2016.
- ALVES, A.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. Processing of degradable ulvan 3D porous structures for biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 101, n. 4, p. 998–1006, 2012.
- ALVES, A. et al. Processing ulvan into 2D structures: Cross-linked ulvan membranes as new biomaterials for drug delivery applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, n. 1, p. 76–81, 2012.
- ALVES, A.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. A practical perspective on ulvan extracted from green algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 2, p. 407–424, 2013.
- AMARAL, I. F. et al. Functionalization of chitosan membranes through phosphorylation: Atomic force microscopy, wettability, and cytotoxicity studies. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, n. 11, p. 276–284, 2006.
- AMARAL, I. F. et al. Rat bone marrow stromal cell osteogenic differentiation and fibronectin adsorption on chitosan membranes: The effect of the degree of acetylation. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 75, n. 2, p. 387–397, 2005.
- American Standard Test Method (ASTM). ASTM F2260-03 (2012)e1 Standard Test Method for Determining Degree of Deacetylation in Chitosan Salts by Proton Nuclear Magnetic Resonance (1H NMR) Spectroscopy, **ASTM International**, 2012. Disponível em: <<https://www.astm.org/Standards/F2260.htm>>. Acesso em: 23 de Janeiro de 2017.
- ANDONNOVA, M. Polyelectrolyte behaviour of poly(vinyl alcohol)-boric acid complexes. **Acta Polymerica**, v. 42, n. 11, p. 589–591, 1991.
- ARAUJO, J. V. et al. Novel porous scaffolds of pH responsive chitosan/carrageenan-

based polyelectrolyte complexes for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 102, n. 12, p. 4415–4426, 2014.

ARMSTRONG, P. B.; ARMSTRONG, M. T. Intercellular invasion and the organizational stability of tissues: A role for fibronectin. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1470, n. 2, 2000.

ASHTON, R. S. et al. Scaffolds based on degradable alginate hydrogels and poly(lactide-co-glycolide) microspheres for stem cell culture. **Biomaterials**, v. 28, n. 36, p. 5518–5525, 2007.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. DA. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 223–228, 2003.

Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO). Dados Numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: Janeiro / Março – 2015. **Registro Brasileiro de Transplante**. Ano XXI, Nº1. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2015/rbt201508052015-lib.pdf>. Acesso em: 12 de Setembro de 2015.

ATALA, A. et al. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. **Lancet**, v. 367, n. 9518, p. 1241–1246, 2006.

ATALA, A. Engineering organs. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n.5, p. 575-592, 2009.

BAER, P. C.; GEIGER, H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: Tissue localization, characterization, and heterogeneity. **Stem Cells International**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

BAPTISTA, P. M. et al. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. **Hepatology**, v. 53, n. 2, p. 604–617, 2011.

BARANIAK, P. R. et al. Stiffening of Human Mesenchymal Stem Cell Spheroid Microenvironments Induced by Incorporation of Gelatin Microparticles. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 11, p. 63–71, 2012.

BARANIAK, P. R.; MCDEVITT, T. C. Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential. **Cell and Tissue Research**, v. 347, p. 701–711, 2012.

BARTOSH, T. J. et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 31, p. 13724–13729, 2010.

BATTULA, V. L. et al. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free , b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4

and give rise to multilineage differentiation. **Differentiation**, v. 75, p. 279–291, 2007.

BAXTER, A. et al. Improved method for I.R. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 14, p. 166–169, 1991.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 35-52, 2004.

BERTÉ, S.D. **Heteroramnanas sulfatadas nativas e modificadas quimicamente obtidas da macroalga verde *Gayralia brasiliensis*: estrutura química e atividades biológicas**. 184p. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

BERTRAND, P. et al. Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: suitable materials, structure and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 7, p. 319-348, 2000.

BETHELL, D. E.; SHEPPARD, N. The infra-red spectrum and structure of boric acid. **Trans. Faraday Soc.**, v. 51, p. 9–15, 1954.

BHANG, S. H. et al. Angiogenesis in ischemic tissue produced by spheroid grafting of human adipose-derived stromal cells. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2734–2747, 2011.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 83–99, 2010.

BIANCO, P. et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. **Stem cells**, v. 19, n. 3, p. 180–192, 2001.

BICUDO, C. E. D. M.; MENEZES, M. Introdução: As Algas Do Brasil. **Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 1, p. 49–60, 2010.

BIDARRA, S. J.; BARRIAS, C. C.; GRANJA, P. L. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 4, p. 1646–1662, 2014.

BILAN, M.I., VINOGRADOVA, E.V., TSVETKOVA, E.A., GRACHEV, A.A., SHASHKOV, A.S., NIFANTIEV, N.E., USOV, A.I. A sulfated glucuronofucan containing both fucofuranose and fucopyranose residues from the brown alga *Chordaria flagelliformis*, **Carbohydr. Res.** 343(15), 2605–2612, 2008.

BLACK, L. L. et al. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. **Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine**, v. 8, n. 4, p. 272–284, 2007.

BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells : characteristics and

clinical applications. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, v. 44, n. 4, p. 215–230, 2006.

BRADING, J. W. E.; GEORG-PLANT, M. M. T.; HARDY, D. M. The polysaccharide from the Alga *Ulva lactuca*. Purification, Hydrolysis, and Methylation of the Polysaccharide. **Journal of the Chem. Soc.**, p. 319–324, 1954.

BRAET, F.; DE ZANGER, R.; WISSE, E. Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells. **Journal of Microscopy**, v. 186, n. 1, p. 84–87, 1997.

BRAGA, M. DO R. DE A.; FUJII, M. T.; CORDEIRO-MARINO, M. Monostromatic green algae (Ulvales, Chlorophyta) of São Paulo and Paraná states (Brazil): distribution, growth, and reproduction. **Revta Brasil Bot.**, v. 20, n. 2, p. 197–203, 1997.

BRANDON, S. V. et al. Hydrogels in Regenerative Medicine. **Advanced Materials**, v. 21, p. 3307–3329, 2009.

BRUGNEROTTO, J. et al. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, p. 3569–3580, 2001.

BUDIANI-SABERI, D. A.; DELMONICO, F. L. Organ trafficking and transplant tourism: A commentary on the global realities. **American Journal of Transplantation**, v. 8, n. 5, p. 925–929, 2008.

BUNNELL, B. A.; FLAAT, M.; GAGLIARDI, C.; PATEL, B.; RIPOLL, C. Adipose derived stem cell: Isolation, expansion and differentiation. **Methods**. v. 45. n. 2. p.115-120, 2008.

CAPITANIA, D. et al. NMR study of a novel chitosan-based hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, p. 245–252, 2001.

CAPLAN, A. I. Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, p. 341–347, 2007.

CÁRDENA, G., CUELLAR, J.D; NEIRA, K. Synthesis and characterization of carboxymethyl chitosan-arg and carboxymethyl chitosan-lys derivatives. **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 49, n. 3, 237-240, 2004.

CASSOLATO, J. E. F. et al. Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 18, p. 3085–3095, 2008.

CASTRO, L. A. S. Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura. **Embrapa Clima Temperado**, Pelotas, Documentos 93, 37p, 2002.

CHAMBERS, I.; SMITH, A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. **Oncogene**, v. 23, n. 43, p. 7150–7160, 2004.

CHANDINI, S. K.; GANESAN, P.; BHASKAR, N. *In vitro* antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 707–713, 2008.

CHAPMAN, R. L., BUCHHEIM, M. A., DELWICHE, C. F., FRIEDL, T., HUSS, V. A. R., KAROL, K. G., LEWIS, L. A., MANHART, J., MCCOURT, R. M., OLSEN, J. L., AND WATERS, D. A. Molecular systematics of the green algae. **Molecular Systematics of Plants II**, p. 508–540, 1998.

CHEN, X., KNIGHT, D. P., VOLLRATH, F. Rheological characterization of nephila spidroin solution. **Biomacromolecules**, 3(4), pp. 644-8, 2002.

CHENG, N. C.; WANG, S.; YOUNG, T. H. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. **Biomaterials**, v. 33, n. 6, p. 1748–1758, 2012.

CHETRI, P.; DASS, N. N.; SARMA, N. SEN. Conductivity measurement of poly(vinyl borate) and its lithium derivative in solid state. **Materials Science and Engineering B**, v. 139, n. 2–3, p. 261–264, 2007.

CHIU, C. et al. Differential Expression of Telomerase Activity in Hematopoietic Progenitors from Adult Human Bone Marrow. **Stem Cells**, p. 239–248, 1996.

CHUNG, I. K. et al. Using marine macroalgae for carbon sequestration: A critical appraisal. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 5, p. 877–886, 2011.

CIPOLLESCHI, M. G; SBARBA, P. D.; OLIVOTTO, M. The role of Hypoxia in the Maintenance of Hematopoietic Stem Cells. **Blood**, v. 82, n. 7, p. 2031-2037, 1993.

CLARK, R. A. Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. **J. Invest. Dermatol.**, v. 94, n. 6, p. 128S–134S, 1990.

CLASEN, C. et al. Effects of different drying processes on the material properties of bacterial cellulose membranes. **Macromolecular Symposia**, v. 244, p. 48–58, 2006.

COHEN, I. G. Transplant Tourism: The Ethics and Regulation of International Markets for Organs. **Global Health and the Law**, p. 269–285, 2013.

CONGET, P. A; MINGUELL, J. J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. **Journal of cellular physiology**, v. 181, n. 1, p. 67–73, 1999.

CONLEY, R.T. Infrared Spectroscopy. **Allyn and Bacon Inc.**, Boston, 179-181, 1966.

CORAZZARI, I. et al. Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. **Polymer Degradation and Stability**, v. 112, p. 1–9, 2015.

CORDEIRO-MARINO, M., BRAGA, M. R. A., FUJII, M. T., GUIMARÃES, S. M. P. B. & MITSUGUI, E. Monostromatic green algae from Espírito Santo State, Brazil: life-

history, growth and reproduction in culture. **Rev. Bras. Biol.**, v. 53, n. 2, p. 285-293, 1993.

CSETE, M. Oxygen in the cultivation of stem cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1049, p. 1–8, 2005.

COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; CORDEIRO, S. L.; OLIVEIRA, R. M.; SABRY, D. A.; CÂMARA, R. B. G.; NOBRE, L. T. D. B.; COSTA, M. S. S. P., ALMEIDA-LIMA, J.; FARIAS, E. H. C.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, n. 1, p. 21–28, 2010.

CURCIO, E. et al. Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. **Biomaterials**, v. 28, n. 36, p. 5487–5497, 2007.

D'AYALA, G. G.; MALINCONICO, M.; LAURIENZO, P. Marine derived polysaccharides for biomedical applications: Chemical modification approaches. **Molecules**, v. 13, n. 9, p. 2069–2106, 2008.

DABRAL, M.; FRANCIS, L. F.; SCRIVEN, L. E. Drying process paths of ternary polymer solution coating. **AIChE Journal**, v. 48, n. 1, p. 25–37, 2002.

DAGALAKIS, N. et al. Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 14, p. 511–528, 1980.

DANG, S. M. et al. Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, n. 4, p. 442–453, 2002.

DASH, M. et al. Biofunctionalization of Ulvan Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, p. 3211–3218, 2014.

DAUTZENBERG, H. Polyelectrolyte complex formation in highly aggregating systems. 1. Effect of salt: Polyelectrolyte Complex Formation in the presence of NaCl. **Macromolecules**, v. 30, p. 7810–7815, 1997.

DAWSON, E. et al. Biomaterials for stem cell differentiation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 2, p. 215–228, 2008.

DE CLERCK, O. et al. Algal Taxonomy: A Road to Nowhere? **Journal of Phycology**, v. 49, n. 2, p. 215–225, 2013.

DE LA FUENTE, M. et al. Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 100–117, 2010.

DE ROSA, A. et al. A New Method for Cryopreserving Adipose-Derived Stem Cells: An Attractive and Suitable Large-Scale and Long-Term Cell Banking Technology. **Tissue Engineering Part C**, v. 15, n. 4, p. 659–667, 2009.

DELAERE, P. R.; VAN RAEMDONCK, D. The trachea: The first tissue-engineered organ? **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 147, n. 4, p. 1128–1132, 2014.

DERGUNOV, S. A.; MUN, G. A. Y-irradiated chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as pH-sensitive protein delivery system. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, n. 1, p. 65–68, 2009.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the sulphate ester of sulphated polysaccharide. **Biochemical Journal**, v. 84, p. 106-110, 1962.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells . The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DOMARD, A., GEY, C., RINAUDO, M., TERRASSIN, C. New method for the quaternization of chitosan. **Int J Biol Macromol.**, v. 8, n. 2, p. 105-107, 1987.

DOWNIE, S. A; NEWMAN, S. A. Different roles for fibronectin in the generation of fore and hind limb precartilaginous condensations. **Developmental biology**, v. 172, n. 2, p. 519–530, 1995.

DUARTE, M. L. et al. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, n. 1–3, p. 1–8, 2002.

DUTKOWSKI, P.; ROUGEMONT, O. DE; CLAVIEN, P. A. Alexis Carrel: Genius, Innovator and Ideologist. **American Journal of Transplantation**, v. 8, n. 1, p. 1998–2003, 2008.

EGUSA, H. et al. Neuronal Differentiation of Bone Marrow-derived Stromal Stem Cells Involves Suppression of Discordant Phenotypes through Gene Silencing. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23691–23697, 2005.

EL-SHERBINY, I.; YACOUB, M. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. **Global cardiology science & practice**, v. 2013, n. 3, p. 316–342, 2013.

EZASHI, T.; DAS, P.; ROBERTS, R. M. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 13, p. 4783–4788, 2005.

FANG, L. L. et al. Life cycle assessment as development and decision support tool for wastewater resource recovery technology. **Water Research**, v. 88, p. 538–549, 2016.

FERNANDES, D. R. P.; DE OLIVEIRA, V. P.; YONESHIGUE VALENTIN, Y. Seaweed biotechnology in Brazil: Six decades of studies on natural products and their antibiotic and other biological activities. **Journal of Applied Phycology**, v. 26,

n. 5, p. 1923–1937, 2014.

FERNANDEZ-MEGIA, E. et al. Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan by ^1H -NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 2, p. 155–161, 2005.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FILOMENA, M. et al. Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications. **Marine Drugs**, v. 13, p. 2967–3028, 2015.

FITZGERALD, R., KEIL, K., HEINRICH, K.F.J. Solid-state energy-dispersive spectrometer for electron-microprobe X-ray analysis. **Science**, v. 159, n. 3814, p. 528–530, 1968.

FLEURENCE, J. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 25–28, 1999.

FRANCESKO, A.; TZANOV, T. Chitin, Chitosan and Derivatives for Wound Healing and Tissue Engineering. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 125, p. 1–27, 2011.

FRANCIS, G. et al. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 6, p. 587-605, 2002.

FRANQUESA, M. et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. **Stem Cells**, v. 33, n. 3, p. 880–891, 2015.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 16, n. 3, p. 381–390, 1966.

FUCHS, E.; SEGRE, J. A. Stem Cells: A New Lease on Life. **Cell**, v. 100, p. 143–155, 2000.

GARG, T.; GOYAL, A. K. Biomaterial - based scaffolds - current status and future directions. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 11, n. 5, p. 767–789, 2014.

GERECHT, S. et al. Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 27, p. 11298–11303, 2007.

GIBAS-DORNA, M. et al. Liposuction-induced metabolic alterations – the effect on insulin sensitivity, adiponectin, leptin and resistin. **Journal of Medical Science**, v. 84, n. 4, p. 249–256, 2015.

GORAD, M.; DÉCORDÉ, K.; VENTURA, E.; SOTERAS, G.; BACC OU, J. C. Polysaccharides from the green alga *Ulva rigida* improve the antioxidant status and prevent fatty streak lesions in the high cholesterol fed hamster, an animal model of nutritionally-induced atherosclerosis. **Food Chem.**, v. 115, n. 1, p. 176–180, 2009.

GRAHAM N. A. J., CHABANET P., EVANS R. D., JENNINGS S. Extinction vulnerability of coral reef fishes. **Ecol Lett.**, v. 14, n. 4, p. 341–348, 2011.

GRAYSON, W. L. et al. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 3, p. 948–953, 2007.

GREENWOOD, H. L. et al. Regenerative medicine : new opportunities for developing countries. **Int. J. Biotechnology**, v. 8, n. 1/2, p. 60–77, 2006.

GRONTHOS, S. et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. **Journal of cellular physiology**, v. 189, n. 1, p. 54–63, 2001.

GROSSKINSKY, U. Biomaterial regulations for tissue engineering. **Desalination**, v. 199, p. 265–267, 2006.

GUIRY, M. D. How Many Species Of Algae Are There ? **Journal Phycol.**, v. 48, n. 5, p. 1057–1063, 2012.

HAMMAN, J. H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1305–1322, 2010.

HAMSHER, S. E. et al. Barcoding diatoms: Exploring alternatives to COI-5P. **Protist**, v. 162, n. 3, p. 405–422, 2011.

HARDING, S. E., MUZZARELL, I R. A. A., PETER, M. G. Characterization of chitosan–mucin complexes by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. **Chitin Handbook**, p. 457-466, 1997.

HARVEY, E. J. et al. Effect of flexibility of the femoral stem on bone-remodeling and fixation of the stem in a canine total hip arthroplasty model without cement. **J Bone Joint Surg Am**, v. 81, n. 1, p. 93-107, 1999.

HAUG, A. The influence of borate and calcium on the gel formation of a sulfated polysaccharide from *Ulva lactuca*. **Acta Chem. Scand B.**, v. 30, n. 6, p. 562-566, 1976.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 89, n. 2, p. 151–165, 2003.

HENDERSON, W. G. et al. The interconversion of aqueous boron species and the interaction of borate with diols: a ^{11}B N.M.R. study. **Carbohydrate Research**, v. 28, n. 1, p. 1–12, 1973.

HEUX, L. et al. Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin

and chitosan. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 746–751, 2000.

HILT, J. Z. et al. Ultrasensitive Biomems Sensors Based on Microcantilevers Patterned with Environmentally Responsive Hydrogels. **Biomedical Microdevices**, v. 5, n. 3, p. 177–184, 2003.

HINTZE, V.; MIRON, A.; MÖLLER, S.; SCHNABELRAUCH, M.; HEINEMANN, S.; WORCH, H.; SCHARNWEBER, D. Artificial extracellular matrices of collagen and sulphated hyaluronan enhance the differentiation of human mesenchymal stem cells in the presence of dexamethasone. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 8, n. 4, p. 314–324, 2014.

HO, M. H. et al. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods. **Biomaterials**, v. 25, n. 1, p. 129–138, 2004.

HOARE, T. R.; KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymer**, v. 49, n. 8, p. 1993–2007, 2008.

HOEK, C.; MANN, D.; JAHNS, H. M. **Algae: An Introduction to Phycology**, 1995. Disponível em: <https://books.google.be/books?id=s1P855ZWc0kC&pg=PA67&lpg=PA67&dq=porphyridium+purpureum&source=bl&ots=3FAnMhCshe&sig=UqskTEtQd7E_yNCaNkSXP Mk0pP8&hl=nl&sa=X&ved=0ahUKEwicg5zE6KHQA hUMI8AKHYrTB08Q6AEIbDAM#v=onepage&q=porphyridium purpureum&f=false>. Acesso em: 16 de Novembro de 2016

HOLDT, S. L.; KRAAN, S. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 543–597, 2011.

HOLZAPFEL, B. M. et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 4, p. 581–603, 2013.

HORI, H.; LIM, B. L.; OSAWA, S. Evolution of green plants as deduced from 5S rRNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 2, p. 820–823, 1985.

HORI, H.; OSAWA, S. Origin and Evolution of Organisms as Deduced from 5S Ribosomal RNA Sequences. **Mol. Biol. Evolution**, v. 4, n. 5, p. 445–472, 1987.

HOSTETTLER, F. et al. **Process for preparation of slippery, ten aciously adhering, hydrophilic polyurethane hydrogel coating, coated polymer and metal substrate materials and coated medical devices**. US00608048, 2000.

HSU, S. H. et al. Evaluation of chitosan-alginate-hyaluronate complexes modified by an RGD-containing protein as tissue-engineering scaffolds for cartilage regeneration. **Artificial Organs**, v. 28, n. 8, p. 693–703, 2004.

HUANG, G. S. et al. Spheroid formation of mesenchymal stem cells on chitosan and chitosan-hyaluronan membranes. **Biomaterials**, v. 32, n. 29, p. 6929–6945, 2011.

HUANG, R. Y. M.; MOON, G. Y.; PAL, R. Chitosan/anionic surfactant complex membranes for the pervaporation separation of methanol/MTBE and characterization of the polymer/surfactant system. **Journal of Membrane Science**, v. 184, n. 1, p. 1–15, 2001.

HULBERT, S. F. et al. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 4, n. 3, p. 433–456, 1970.

HYNES, R.O. **Fibronectins**. Springer-Verlag, New York, 1990.

International Society of Aesthetic Plastic Surgery (ISAPS). **ISAPSNEWS**, v.10, n.2. Disponível em: <<https://www.isaps.org/en/>>. Acesso em:15 de Dezembro de 2016.

International Society of Aesthetic Plastic Surgery (ISAPS). **Procedures Performed in 2015**. Disponível em: <https://www.isaps.org/en/>. Acesso em:15 de Dezembro de 2016.

IM, G. IL; SHIN, Y. W.; LEE, K. B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, n. 10, p. 845–853, 2005.

IRIODA, A. C. et al. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Cryopreservation and Thawing Decrease α 4-Integrin Expression. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

ITO, K.; HORI, K. Seaweed: Chemical composition and potential food uses. **Food Reviews International**, v. 5, n. 1, p. 101–144, 1989.

IZADPANAH, R. et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **J Cell Biochem**, v. 99, n. 5, p. 1285–1297, 2006.

JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDRGREN, H.; LINDBERG, B.; JÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chem. Commun.**, v. 8, p. 1-71, 1976.

JAYA, S.; DURANCE, T. D.; WANG, R. Preparation and Physical Characterization of Gelatin--Starch/Hydroxyapatite Porous Composite Scaffold Fabricated Using Novel Microwave Energy under Vacuum Technique. **Journal of Composite Materials**, p. 1451–1460, 2009.

JIANG, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, n. 4, 2002.

JOLY, A.B. Contribuição ao conhecimento da flora ficológica marinha da Baía de Santos e arredores. **Boletim. Fac. Fil. Ciênc. Univ. São Paulo Botânica**). v. 14, p. 1-196, 1957.

JUNGEBLUTH, P. et al. Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite: A proof-of-concept study. **The Lancet**, v. 378, p. 1997–2004, 2011.

JURGENS, W. J. F. M. et al. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: Implications for cell-based therapies. **Cell Tissue Research**, v. 332, n. 3, p. 415–426, 2008.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 137-138, 1965.

KASAAI, M. R. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 801–810, 2010.

KATZ, A. J. et al. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. **Stem cells**, v. 23, n. 3, p. 412–423, 2005.

KEMP, P. Regenerative Medicine looking backward 10 years further on. **Regenerative Medicine**, p. 1-14, 2016.

KERENYI, K. **Prometheus: Archetypal Image of Human Existence**. Princeton University Press, 1997.

KERN, S. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem cells**, v. 24, n. 5, p. 1294–1301, 2006.

KIKIONIS, S. et al. Electrospun biocomposite nanofibers of ulvan/PCL and ulvan/PEO. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 26, p. 1–5, 2015.

KIM, S.-K. **Springer Handbook of Marine Biotechnology**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2016.

KIM, S. E. et al. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor- β 1: Implications for cartilage tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 91, n. 3, p. 365–374, 2003.

KRATOCHVIL, P. **Classical Light Scattering from Polymer Solutions**. Elsevier Science Publishers: London, 1987. Disponível em: <
https://books.google.com.br/books/about/Classical_light_scattering_from_polymer.html?id=hAzwAAAAMAAJ&redir_esc=y>. Acesso em: 25 de Setembro de 2016.

KOH, W.; ITLE, L. J.; PISHKO, M. V. Molding of Hydrogel Microstructures to Create Multiphenotype Cell Microarrays. **Anal. Chem.** v. 75, n. 21, p. 5783–5789, 2003.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research and Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2007.

KUBOKI, Y., TAKITA, H., KOBAYASHI, D., TSURUGA, E., INOUE, M., MURATA, M., NAGAI, N., DOHI, Y., OHGUSHI, H. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis, **J. Biomed.Mater. Res.** v. 39, n. 2, 190–199, 1998.

KUMAR, R. M. N. V et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspective. **Chemical reviews**, v. 104, p. 6017–6084, 2004.

KUNDU, J. et al. Biomaterials for Biofabrication of 3D Tissue Scaffolds. **Biofabrication**, n. 2, p. 23–46, 2013.

KUROSAWA, H. et al. Effect of oxygen on *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 1, p. 26–30, 2006.

KUZNETSOV, S. A.; FRIEDENSTEIN, A. J.; ROBEY, P. G. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation *in vitro*. **British Journal of Haematology**, v. 97, p. 561–570, 1997.

LAHAYE, M.; INIZAN, F.; VIGOUREUX, J. NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan-boron complex formation. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 2–3, p. 239–249, 1998.

LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and function properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1765–1774, 2007.

LANGER, R.; TIRRELL, D. A. Designing materials for biology and medicine. **Nature**, v. 428, p. 487–492, 2004.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, p. 920–926, 1993.

LAURIENZO, P. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: An overview. **Marine Drugs**, v. 8, n. 9, p. 2435–2465, 2010.

LAVERTU, M. et al. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n. 6, p. 1149–1158, 2003.

LAWRENCE, J.R., NEU, T.R. Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. **Methods in enzymology**, v. 310, p. 131–144, 1999.

LEE, J.; CHENG, Y. Critical freezing rate in freeze drying nanocrystal dispersions. **Journal of Controlled Release**, v. 111, n. 1–2, p. 185–192, 2006.

LEE, K.Y.; MOONEY, D.J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Prog. Polym. Sci.**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.

LEE, R. H. et al. Characterization and Expression Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 14, p. 311–324, 2004.

LEE, W. et al. The use of injectable spherically symmetric cell aggregates self-assembled in a thermo-responsive hydrogel for enhanced cell transplantation. **Biomaterials**, v. 30, p. 5505–5513, 2009.

LEI, L. et al. Biological character of human adipose-derived adult stem cells and influence of donor age on cell replication in culture. **Science in China, Series C: Life Sciences**, v. 50, n. 3, p. 320–328, 2007.

LEIRO, J.M.; CASTRO, R.; ARRANZ, J.A.; LAMAS, J. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* c. agardh. **Int. Immunopharmacol.**, v. 7, p. 879–888, 2007.

LELIAERT, F. et al. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, n. 1, p. 1–46, 2012.

LELIAERT, F.; VERBRUGGEN, H.; ZECHMAN, F. W. Into the deep: New discoveries at the base of the green plant phylogeny. **BioEssays**, v. 33, n. 9, p. 683–692, 2011.

LEVENBERG, S. et al. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 22, p. 12741–12746, 2003.

LHULLIER, C., HORTA, P.A., FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 2, p. 158–163, 2006.

LI, B.; WANG, L.; XU, F.; GANG, X.; DEMIRCI, U.; WEI, D.; LI, Y.; FENG, Y.; JIA, D.; ZHOU, Y. Hydrosoluble, UV-crosslinkable and injectable chitosan for patterned cell-laden microgel and rapid transdermal curing hydrogel *in vivo*. **Acta Biomater**, v. 22, p. 59-69, 2015

LI, J. et al. Iota-carrageenan / chitosan / gelatin scaffold for the osteogenic differentiation of adipose-derived MSCs *in vitro*. **J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater**, p. 1–13, 2014.

LI, L.; XIE, T. Stem Cell Niche : Structure and Function. **The Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 605–631, 2005.

LI, T. et al. Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Alleviate Liver Fibrosis. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 6, p. 845–854, 2013.

LI, T.-S. et al. Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair. **Stem Cells**, v. 28, n. 11, p. 2088–2098, 2010.

LI, Z.; LI, L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 10, p. 589–595, 2006.

LIMA-FILHO, J. V. M., CARVALHO, A. F. F. U., SISSI, M. F., MELO, V. M. M.

Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. **Braz J Microbiol.**, v. 33, p. 311–313, 2002.

LIN, C. C.; ANSETH, K. S. PEG hydrogels for the controlled release of biomolecules in regenerative medicine. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 3, p. 631–643, 2009.

LIN, R. Z. et al. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: Roles of E-cadherin and β 1-integrin. **Cell and Tissue Research**, v. 324, n. 3, p. 411–422, 2005.

LIN, R. Z.; CHANG, H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnology Journal**, v. 3, p. 1172–1184, 2008.

LOBBAN, S.C; HARRISON, P. J. **Seaweed Ecology and Physiology**. Cambridge University Press, 2000. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=rZDfAwAAQBAJ&pg=PA511&lpg=PA511&dq=LOBBAN,+S.C.+Seaweed+Ecology+and+Physiology.+Cambridge+University+Press,+2000.&source=bl&ots=KZeylr8NW4&sig=15CRnKvR-oc8tF3lbMI5Psfz8gg&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwjbg7yOrsnUAhVSOZAKHdw8AosQ6AEIUDAG#v=onepage&q=LOBBAN%2C%20S.C.%20Seaweed%20Ecology%20and%20Physiology.%20Cambridge%20University%20Press%2C%202000.&f=false>. Acesso em: 12 de Novembro de 2016.

LOPEZ, F. A. et al. A kinetic study on the thermal behaviour of chitosan. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 91, n. 2, p. 633–639, 2008.

LOWRY, O.H. ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry, Bethesda**, v. 193, p. 265, 1951.

MACCHIARINI, P. et al. First human transplantation of a bioengineered airway tissue. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 128, n. 4, p. 638–641, 2004.

MACCHIARINI, P. et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. **The Lancet**, v. 372, n. 9655, p. 2023–2030, 2008.

MAEDA, Y. et al. Biomechanical analysis on platform switching: Is there any biomechanical rationale? **Clinical Oral Implants Research**, v. 18, n. 5, p. 581–584, 2007.

MAKINO, S. et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 5, p. 697–705, 1999.

MAO, W.; LI, H.; LI, Y.; ZHANG, H.; QI, X.; SUN, H.; CHEN, Y.; GUO, S. Chemical characteristic and anticoagulant activity of the sulfated polysaccharide isolated from *Monostroma latissimum* (Chlorophyta). **International Journal of Biological Macromolecules**, V. 44, n. 1, p. 70–74, 2009.

MATTOS, B.B., ROMANOS, M.T.V., SOUZA, L.M., SASSAKI, G., BARRETO-BERGTER, E. Glycolipids from macroalgae: potential biomolecules for marine biotechnology? **Rev Bras Farmacogn.**, v. 21, n. 2, p. 244–247, 2011.

MATSUHIRO, B. Vibrational spectroscopy of seaweed galactans. **Hydrobiologia**, v. 327, n. 1, p. 481–489, 1996.

MARTINS, C.D.L., RAMLOV, F., NOCCHI CARNEIRO, N.P., GESTINARI, L.M., DOS SANTOS, B.F., BENTO, L.M., LHULLIER, C., GOUVEA, L., BASTOS, E., HORTA, P.A., SOARES, A.R. Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. **J Appl Phycol.**, v. 25, n. 4, p. 1179–1187, 2012.

MASON, C.; DUNNILL, P. A brief definition of regenerative medicine. **Regen. Med.**, v. 3, n. 1, p. 1–5, 2008.

MAUMUS, M. et al. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. **International Journal of Obesity**, v. 35, n. 9, p. 1141–1153, 2011.

MCGUIGAN, A. P.; SEFTON, M. V. Vascularized organoid engineered by modular assembly enables blood perfusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 31, p. 11461–11466, 2006.

MCKINNELL, B. J. P.; PERCIVAL, E.; POWELL, H. Structural Investigations on the water-soluble polysaccharide of the green seaweed *Enteromorpha compressa*. **Journal of Chemical Society**, p. 3141–3148, 1961.

MEDCALF, D. G. et al. Seasonal variations in the mucilaginous polysaccharides from *Ulva lactuca*. **Botanica Marina**, v. 18, n. 2, p. 67–70, 1975.

MELKONIAN, M. Flagellar apparatus ultrastructure in relation to green algal classification. **Systematics of the green algae**, pp. 73–120, 1984.

MENEZES, M.; BICUDO, C. E. M.; CARLOS W. N. MOURA, ET AL. Update of the Brazilian floristic list of Algae and Cyanobacteria. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1047–1062, 2015.

MIHAILA, S. M. et al. Photocrosslinkable Kappa-Carrageenan Hydrogels for Tissue Engineering Applications. **Advanced Healthcare Materials**, v. 2, p. 895–907, 2013.

MINGUELL J.J., ERICES A., CONGET P. Mesenchymal stem cells. **Exp Biol Med.**, v. 226, n. 6, p. 507–520, 2001.

MIRONOV, V. et al. Organ printing: Computer-aided jet-based 3D tissue engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 157–161, 2003.

MISHLER, B. D. et al. Phylogenetic Relationships of the “Green Algae” and “Bryophytes”. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, n. 3, p. 451–483, 1994.

MITCHELL, J. B. et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. **Stem cells**, v. 24, n. 2, p. 376–385, 2006.

MOGHARABIA, M.; MOHAMMAD ALI, F. Are Algae the Future Source of Enzymes? **Trends in Peptide and Protein Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1–6, 2016.

MOREIRA, D.; PIRES, J. C. M. Atmospheric CO₂ capture by algae: Negative carbon dioxide emission path. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 371–379, 2016.

MORELLI, A.; CHIELLINI, F. Ulvan as a new type of biomaterial from renewable resources: Functionalization and hydrogel preparation. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 211, n. 7, p. 821–832, 2010.

MORLA, A.; RUOSLAHTI, E. A fibronectin self-assembly site involved in fibronectin matrix assembly: Reconstruction in a synthetic peptide. **The Journal of Cell Biology**, v. 118, n. 2, p. 421–429, 1992.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOSNA, F.; SENSEBE, L. Human Bone Marrow and Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells : A User ' s Guide. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 10, 2010.

MUCHA, M.; PIEKIELNA, J.; WIECZOREK, A. Characterisation and morphology of biodegradable chitosan / synthetic polymer blends. **Macromolecular Symposia**, v. 144, n. 1, p. 391–412, 1999.

MULLOY B. The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 77, n. 4, p. 651–664, 2005.

MUMPER, R.J., WANG, J., CLASPELL, J.M., ROLLAND, A.P. Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. **Proceedings of the Controlled Release Society**, n. 22, p. 178-179, 1995.

MURAKAMI, K. et al. Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. **Biomaterials**, v. 31, n. 1, p. 83–90, 2010.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 167–182, 2009.

MUZZARELLI, R. A. A.; ROCCHETTI, R. The Determination of the Degree of Acetylation of Chitosans by Spectrophotometry. **Chitin in Nature and Technology**, p. 385-388, 1986.

NAGAOKA, M., SHIBATA, H., KIMURA, I., HASHIMOTO, S. **Oligosaccharide derivatives and process for producing the same**. US6645940 B2, 2003.

NAIR, L. S. et al. Development of injectable thermogelling chitosan-inorganic

phosphate solutions for biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 12, p. 3779–3785, 2007.

NAM, Y. S.; YOON, J. J.; PARK, T. G. A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 53, n. 1, p. 1–7, 2000.

NEISS, T.G. Nuclear magnetic resonance instrumentation. Em MEYERS, R. A. **Encyclopedia of analytical chemistry: Application, theory and instrumentation**, v. 14, p. 12089–12113. John Wiley & Sons, New York, 2000.

NEREM, R.M; SAMBANIS, A. Tissue engineering: from biologic to biological substitutes. **Tissue engineering**, v. 1, n. 1, p. 3 – 13, 1995.

NIELSEN, J. S.; MCNAGNY, K. M. Novel functions of the CD34 family. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 22, p. 3683–3692, 2008.

NIETO, J. M.; PENICHE-COVAS, C.; PADRO´N, G. Characterization of chitosan by pyrolysis-mass spectrometry, thermal analysis and differential scanning calorimetry. **Thermochimica Acta**, v. 176, p. 63–68, 1991.

NURDIN, N.; FRANCOIS, N.; SIDOUNI, F.; DESCOUTS, P. Em DORMAND, A.; ROBERTS, GAF; VARUM, KM. **Advances in chitin science**, v. 2. p. 378-383. Jacques Andre, Lyon, 1998.

OGATA, Y. et al. Purified Human Synovium Mesenchymal Stem Cells as a Good Resource for Cartilage Regeneration. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–12, 2015.

OHKAWA, K.; CHA D.; KIM, H.; NISHIDA, A.; YAMAMOTO, H. Electrospinning of chitosan. **Macromol Rapid Commun**, v. 25, n. 18, p.1600–1605, 2004.

ORLANDO, G. et al. Regenerative medicine as applied to solid organ transplantation: current status and future challenges. **Transplant International**, v. 24, p. 223–232, 2011a.

ORLANDO, G. et al. Regenerative Medicine and Organ Transplantation: Past , Present , and Future. **Transplantation**, v. 91, p. 1310–1317, 2011b.

OSMAN, Z.; AROF, A. K. FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 48, n. 8, p. 993–999, 2003.

OTT, H. C. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart. **Nature medicine**, v. 14, n. 2, p. 213–221, 2008.

OTT, H. C. et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. **Nature Medicine**, v. 16, n. 8, p. 927–933, 2010.

OTTØY, M. H.; VÅRUM, K. M.; SMIDSRØD, O. Compositional heterogeneity of heterogeneously deacetylated chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, n. 1, p. 17–24, 1996.

OWEN, J. J. T.; MOORE, N. C. Thymocyte-stromal-cell interactions and T-cell selection. **Immunology Today**, v. 16, n. 7, p. 336-338, 1995.

PADOIN, A. V. et al. Sources of processed lipoaspirate cells: influence of donor site on cell concentration. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 122, n. 2, p. 614–618, 2008.

PARENTEAU, N. Skin : the First Tissue-Engineered Products. **Scientific American**, p. 83–85, 1999.

PARK, D. J. et al. Injectable bone using chitosan-alginate gel/mesenchymal stem cells/BMP-2 composites. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 33, n. 1, p. 50–54, 2005.

PARK, J.; LAKES, R.S. **Biomaterials: An Introduction**. Springer Science & Business Media, 2007.

PARK, S.; LEE, K.W.; LIM, D.; LEE, S. The Sulfated Polysaccharide Fucoidan Stimulates Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. **Stem cells and development**, v. 21, n. 12, p. 2204-2211, 2012.

PATEL, A.; MEQUANINT, K. Hydrogel Biomaterials. **Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges**, p. 275-296, 2011.

PAWLAK, A.; MUCHA, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. **Thermochimica Acta**, v. 396, n. 1–2, p. 153–166, 2003.

PEDRINI, A. G. **Macroalgas (Chlorophyta) e gramas marinhas (Magnoliophyta) do Brasil**. Flora Marinha do Brasil. Technical Books, v. 2, Rio de Janeiro, 2011.

PELLIZZARI, F. et al. Morphology, ontogeny, and phylogenetic position of *Gayralia brasiliensis* sp. nov. (Ulotrichales, Chlorophyta) from the southern coast of Brazil. **Botanica Marina**, v. 197, p. 1–9, 2013.

PENGZHAN, Y. et al. Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 1, p. 21–27, 2003.

PEPPAS, N. A. et al. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 27–46, 2000.

PEPPAS, N. A.; LANGER, R. New Challenges in Biomaterials. **Science**, v. 263, n. 5154, p. 1715-1720, 1994.

PERCIVAL, E. The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. **British Phycological Journal**, v. 14, n. 2, p. 103–117, 1979.

PERCIVAL, E. & WOLD, J. K.. The acid polysaccharide from the green seaweed, *Ulva lactuca*. Pt. II. The site of the ester sulphate. **Journal of the Chem. Soc.**, p. 5459-5468. ,1963.

PEREIRA, L. et al. Vibrational Spectroscopy (FTIR-ATR And FT-RAMAN) A Rapid and Useful Tool for Phycocolloid Analysis. **BIODEVICES 2009 - International Conference on Biomedical Electronics and Devices**, p. 131–136, 2009.

PETERSEN, T. H. T. et al. Tissue-engineered lungs for *in vivo* implantation. **Science**, v. 329, n. 5991, p. 538–541, 2010.

PHILIPP, B. et al. Polyelectrolyte Complexes - Recent Developments and Open Problems. **Prog. Polym. Sci.**, v. 14, p. 91-172, 1989.

PHINNEY, D. G.; PROCKOP, D. J. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair-Current Views. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2896–2902, 2007.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, v. 284, n. 2, 1999.

PLANAT-BENARD, V. Plasticity of Human Adipose Lineage Cells Toward Endothelial Cells: Physiological and Therapeutic Perspectives. **Circulation**, v. 109, p. 656–663, 2004.

PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. In the search of new functional food ingredients from algae. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, n. 1, p. 31–39, 2008.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 8, p. 859–865, 2005.

PRZEKORA, A.; PALKA, K.; GINALSKA, G. Chitosan/-1,3-glucan/calcium phosphate ceramics composites—Novel cell scaffolds for bone tissue engineering application. **Journal of Biotechnology**, v. 182–183, p. 46–53, 2014.

QI, H.; ZHANG, Q.; ZHAO, T.; CHEN, R.; ZHANG, H.; NIU, X.; LI, Z. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 37, n. 4, p. 195-199, 2005.

RAMOS, G. J. P.; CARLOS, C. E.; CARLOS, C. W. *Oocystis apicurvata* sp. nov. (Oocystaceae, Trebouxiophyceae), a new species of green algae from Chapada Diamantina, northeast Brazil. **Revista Brasileira de Botanica**, v. 38, n. 1, p. 171–173, 2015.

RANI, M.; AGARWAL, A.; NEGI, Y. S. Review: Chitosan based Hydrogel polymeric beads - as drug delivery system. **BioResources**, v. 5, n. 4, p. 2765–2807, 2010.

RAVI KUMAR, M. N. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and**

Functional Polymers, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.

RAY, B.; LAHAYE, M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta). Chemical structure of ulvan. **Carbohydrate Research**, v. 274, p. 313–318, 1995.

RICCIARDI, R. et al. Short Time Dynamics of Solvent Molecules and Supramolecular Organization of Poly (vinyl alcohol) Hydrogels Obtained by Freeze/Thaw Techniques. **Macromolecules**, v. 38, p. 6629–6639, 2005.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; LE DUNG, P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **Macromolecules**, v. 15, n. 5, p. 281–285, 1993.

ROBEY, P. G. Stem cells near the century mark. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 11, p. 1489–1491, 2000.

ROBIC, A. et al. Determination of the chemical composition of ulvan, a cell wall polysaccharide from *Ulva* spp. (Ulvales, Chlorophyta) by FT-IR and chemometrics. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 4, p. 451–456, 2009a.

ROBIC, A. et al. Ultrastructure of Ulvan: A polysaccharide from green seaweeds. **Biopolymers**, v. 91, n. 8, p. 652–664, 2009b.

ROBINSON, E. E.; FOTY, R. A.; CORBETT, S. A. Fibronectin Matrix Assembly Regulates $\alpha 5 \beta 1$ -mediated Cell Cohesion. **Molecular biology of the cell**, v. 15, p. 973–981, 2004.

ROCKWOOD, D. N. et al. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. **Nature Protocols**, v. 6, n. 10, p. 1612–1631, 2011.

RODRIGUES, A. P. et al. The Influence of Preparation Conditions on the Characteristics of Chitosan-Alginate Dressings for Skin Lesions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, p. 2703–2710, 2008.

RODRIGUES, J.A.G; VANDERLEI, E.S.O.; SILVA, L.M.C.M.; ARAÚJO, I.W.F.; QUEIROZ, I.N.L.; PAULA, G.A.; ABREU, T.M.; RIBEIRO, N.A.; BEZERRA, M.M.; CHAVES, H.V.; LIMA, V.; JORGE, R.J.B.; MONTEIRO, H.S.A.; LEITE, E.L.; BENEVIDES, N.M.B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. **Pharmacolog. Rep.**, v. 64, n. 2, p. 282-292, 2012.

ROPELLATO, J. **Estrutura química e atividade antitumoral de heteroramnanas sulfatadas e seus produtos de degradação parcial obtidos da macroalga verde *Gayralia oxysperma***. 131p. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

ROPELLATO, J. et al. Sulfated heterorhamnans from the green seaweed *Gayralia oxysperma*: Partial depolymerization, chemical structure and antitumor activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 476–485, 2015.

ROSOVA, I. et al. Hypoxic Preconditioning Results in Increased Motility and Improved Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 8, p. 2173–2182, 2008.

RUOSLAHTI, E. Integrins. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 1, p. 1–5, 1991.

SALOMONSEN, T. et al. Chemometric prediction of alginate monomer composition: A comparative spectroscopic study using IR, Raman, NIR and NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 4, p. 730–739, 2008.

SAMARAKOON, K.; JEON, Y. J. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - A review. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 948–960, 2012.

SANTHOSH KUMAR, K.; PRASANTHKUMAR, S.; RAY, J. G. Experimental assessment of productivity, oil-yield and oil-profile of eight different common freshwater-blooming green algae of Kerala. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 270–277, 2016.

SANTO, V. E. et al. Carrageenan-based hydrogels for the controlled delivery of PDGF-BB in bone tissue engineering applications. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 6, p. 1392–1401, 2009.

SANTOS, M.G.M., LAGROTA, M.H.C., MIRANDA, M.M.F.S., YONESHIGUE-VALENTIN, Y., WIGG, M.D. A screening for the antiviral effect of Brazilian marine alga extracts against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. **Botanica Marina**, v. 42, n. 3, p. 227–230, 1999.

SAOTOME, K.; MORITA, H.; UMEDA, M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. **Toxicology in Vitro**, v. 3, n. 4, p. 317–321, 1989.

SASHIWA, H.; AIBA, S. I. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 29, n. 9, p. 887–908, 2004.

SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A. J.; SOUZA, L.M.; CZELUSNIAK, P.A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards from GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydr. Res.**, v. 340, n. 4, p. 731–739, 2005.

SATO, H. et al. Determination of the degree of acetylation of chitin/chitosan by pyrolysis-gas chromatography in the presence of oxalic Acid. **Analytical chemistry**, v. 70, n. 1, p. 7–12, 1998.

SATO, T.; LAVER, J. H.; OGAWA, M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. **Blood Journal**, v. 94, n. 8, p. 2548–2554, 1999.

SAUNDERS, G. W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 360, n. 1462, p. 1879–1888, 2005.

SCHENKE-LAYLAND et al. Adipose Tissue-Derived Cells Improve Cardiac Function Following Myocardial Infarction. **J Surg Res.**, v. 153, n. 2, p. 217–223, 2010.

SCHEPER-HUGHES, N. The Global Traffic in Human Organs. **Current anthropology**, v. 41, n. 2, p. 191–224, 2000.

SCHMID, I. et al. Dead Cell Discrimination With 7-Amino-Actinomycin D in Combination With Dual Color Immunofluorescence in Single Laser Flow Cytometry. **Cytometry**, v. 13, p. 204–208, 1992.

SCHONHOFF, M. Layered polyelectrolyte complexes: physics of formation and molecular properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 15, p. 1781–1808, 2003.

SCHWAB, K. E.; GARGETT, C. E. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. **Human Reproduction**, v. 22, n. 11, p. 2903–2911, 2007.

SEARLES, J. A.; CARPENTER, J. F.; RANDOLPH, T. W. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 7, p. 860–871, 2001.

SHARMA, A. et al. Algae as crucial organisms in advancing nanotechnology: a systematic review. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 3, p. 1759–1774, 2016.

SHI, C. et al. Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine. **Journal of Surgical Research**, v. 133, n. 2, p. 185–192, 2006.

SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 18, n. 4, p. 696–704, 2003.

SHIGEMASA, Y. et al. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 18, n. 3, p. 237–242, 1996.

SHIMAZONO, Y. The state of the international organ trade: a provisional picture based on integration of available information. **Bulletin of the World Health Organisation**, v. 85, n. 12, p. 955–962, 2007.

SIDDHANTA, A. K. et al. Water soluble polysaccharides of marine algal species of *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) of Indian waters. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 30, p. 166–172, 2001.

SILVA, T. M. A., ALVES, L. G., QUEIROZ, K. C. S., SANTOS, M. G. L., MARQUES, C. T., CHAVANTE, S. F., ROCHA, H. A. O., LEITE, E. L.: Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*, **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 4, p. 523–533, 2005.

SILVA, T. H.; ALVES, A.; FERREIRA, B. M.; OLIVEIRA, J. M.; REYS, L. L.; FERREIRA, R. J. F.; SOUSA, R. A.; SILVA, S. S.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest. **International Material Reviews**, v. 57, n. 5, p. 276-306, 2012.

SILVA, T. H.; ALVES, A.; POPA, E. G.; REYS, L. L.; GOMES, M. E.; SOUSA, R. A.; SILVA, S. S.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Marine algae sulfated polysaccharides for tissue engineering and drug delivery approaches. **Biomatter**, v. 2, n. 4, p. 278–289, 2012.

SMITH, M. E.; FINKE, E. H. Critical point drying of soft biological material for the scanning electron microscope. **Investigative ophthalmology**, v. 11, n. 3, p. 127–132, 1972.

SOCIETY, T. C. OF T. T. Commercialisation in transplantation: The problems and some guidelines for practice. **The Lancet**, v. 28, p. 715-716, 1985.

STEM CELLS, TISSUE ENGINEERING, BIOBANKING & CAR-T INDUSTRIES. **Global regenerative Medicine Market Analysis & Forecast to 2021**. Kelly Scientific Publications, 2017.

STOFFELS, J. M. J.; ZHAO, C.; BARON, W. Fibronectin in tissue regeneration: Timely disassembly of the scaffold is necessary to complete the build. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 22, p. 4243–4253, 2013.

STRIOGA, M. et al. Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. **Stem Cells and Development**, p. 1–29, 2012.

SUGA, H. et al. Numerical Measurement of Viable and Nonviable Adipocytes and Other Cellular Components in Aspirated Fat Tissue. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 122, n. 1, p. 103–114, 2008.

TABATA, Y.; IKADA, Y. Protein release from gelatin matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, p. 287–301, 1998.

TAN, W.; DESAI, T.A. Layer-by-layer microfluidics for biomimetic three-dimensional structures. **Biomaterials**, v. 25, n. 7-8, p. 1355–1364, 2004.

TELES, H. et al. Hydrogels of collagen-inspired telechelic triblock copolymers for the sustained release of proteins. **Journal of Controlled Release**, v. 147, n. 2, p. 298–303, 2010.

The Council of The Transplantation Society (TTS). Commercialization in transplantation: The problems and some guidelines for practice. **The Lancet**, v. 326, n. 8457, p. 715-716, 1985.

The Organ Procurement and Transplantation Network Web Site (OPTN). Disponível em: <<http://optn.transplant.hrsa.gov/>>. Acesso em: 12 de Setembro de 2015.

THEIN-HAN, W. W.; STEVENS, W. F. Transdermal delivery controlled by a chitosan membrane. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 30, n. 4, p. 397–404, 2004.

THIRUMALA, S.; GIMBLE, J. M.; DEVIREDDY, R. V. Evaluation of Methylcellulose and Dimethyl Sulfoxide as the Cryoprotectants in a Serum-Free Freezing Media for Cryopreservation of Adipose-Derived Adult Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 4, p. 513–522, 2010.

THOMSON, R. C. et al. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. **Journal of Biomaterials Science Polymer Edition**, v. 7, n. 1, p. 23–38, 1995.

THÜNEMANN, A. F. et al. Polyelectrolyte Complexes. **Adv Polym Sci**, v. 166, p. 113–171, 2004.

TOQUET, J. et al. Osteogenic Potential *In Vitro* Of Human Bone Marrow Cells Cultured On Macroporous Biphasic Calcium Phosphate Ceramic. **J Biomed Mater Res**, v. 44, n. 1, p. 98-108, 1999.

TOMIHATA, K.; IKADA, Y. *In Vitro* And *In Vivo* Degradation Of Films Of Chitin And Its Deacetylated Derivatives. **Biomaterials**, v. 18, n. 7, p. 567–575, 1997.

TOSKAS, G. et al. Nanofibers based on polysaccharides from the green seaweed *Ulva Rigida*. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 1093–1102, 2011.

TOSKAS, G. et al. Ulvan and ulvan/chitosan polyelectrolyte nanofibrous membranes as a potential substrate material for the cultivation of osteoblasts. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 997–1002, 2012.

TRINH, N. T. et al. Microvesicles enhance the mobility of human diabetic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells *in vitro* and improve wound healing *in vivo*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 473, n. 4, p. 1111–1118, 2016.

TSAIH, M. L.; CHEN, R. H. Molecular weight determination of 83% degree of decetylation chitosan with non-Gaussian and wide range distribution by high-performance size exclusion chromatography and capillary viscometry. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 71, n. 11, p. 1905–1913, 1999.

TSUCHIDA, E. The formation of higher structure through hydrophobic interaction of interpolymer complexes. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 175, n. 2, p. 603–611,

1974.

TSUCHIDA, E. Formation of Polyelectrolyte Complexes and Their Structures. **Pure and Applied Chemistry**, v. A31, n. 1, p. 1–15, 1994.

TUVIKENE, R., TRUUS, K., KOLLIST, A., VOLOBUJEVA, O., MELLIKOV, E., PEHK, T. Gel-forming structures and stages of red algal galactans of different sulfation levels, **J. Appl. Phycol.**, v. 20, n. 5, p. 77–85, 2008.

UYGUN, B. E. et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. **Nature Medicine**, v. 16, n. 7, p. 814–820, 2010.

VALENTIN, R. et al. Acidity of alginate aerogels studied by FTIR spectroscopy of probe molecules. **Macromolecular Symposia**, v. 230, p. 71–77, 2005.

VAN DE VELDE, F. et al. ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 3, p. 73–92, 2002.

VASHIST, A.; AHMAD, S. Hydrogels in tissue engineering: scope and applications. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 606–620, 2015.

VENKATESAN, J. et al. Seaweed polysaccharides and their potential biomedical applications. **Starch Journal**, v. 66, p. 1–10, 2015.

VIEIRA F. P, CALAND-NORONHA, M. C. Atividade antibiótica de algumas algas marinhas do estado do Ceará. **Arq Cienc Mar.**, v. 11, n. 2, p. 91–93, 1971.

VRENTAS, J. .; VRENTAS, C. Drying of Solvent-Coated Polymer Films. **Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics**, v. 32, p. 187–194, 1994.

WAGNER, J. et al. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 531–536, 2009.

WAGNER, W. et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, v. 33, n. 11, p. 1402–1416, 2005.

WANG, C.-C. et al. Spherically Symmetric Mesenchymal Stromal Cell Bodies Inherent with Endogenous Extracellular Matrices for Cellular Cardiomyoplasty. **Stem Cells**, v. 27, n. 3, p. 724–732, 2009.

WEBBER, M. J. et al. A Perspective on the Clinical Translation of Scaffolds for Tissue Engineering. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 43, n. 3, p. 641–656, 2014.

WEST, J. L.; HUBBELL, J. A. Separation of the arterial wall from blood contact using hydrogel barriers reduces intimal thickening after balloon injury in the rat : The roles of medial and luminal factors in arterial healing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p.

13188–13193, 1996.

WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 16, p. 3269–3276, 2003.

WILLIAMS, D.F. **Definition in biomaterials. Progress in biomedical engineering. Amsterdam.** Elsevier Science, 1987.

WUANG, S. C. et al. Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. **Algal Research**, v. 15, p. 59–64, 2016.

XU, W. et al. Mesenchymal Stem Cells from Adult Human Bone Marrow Differentiate into a Cardiomyocyte Phenotype *In Vitro*. **Exp. Biology and Medicine**, v. 229, p. 623–631, 2004.

YAMAMOTO, M. Physicochemical studies on sulfated polysaccharides extracted from seaweeds at various temperatures. **Agric. Biol. Chem.**, v. 44, n. 3, p. 589–593, 1980.

YANG, Y. et al. Cultivation of seaweed *Gracilaria* in Chinese coastal waters and its contribution to environmental improvements. **Algal Research**, v. 9, p. 236–244, 2015.

YE, H., WANG, K., ZHOU, C., LIU, J., ZENG, X. Purification, antitumor and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. **Food Chem.**, v. 111, n. 2, p. 428–432, 2008.

YEH, J. et al. Micromolding of shape-controlled, harvestable cell-laden hydrogels. **Biomaterials**, v. 27, n. 31, p. 5391–5398, 2006.

YOSHIMURA, K. et al. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: Efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. **Dermatologic Surgery**, v. 34, n. 9, p. 1178–1185, 2008.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. **Mar. Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133–1174, 2015.

YU, P.; GU, H. Bioactive Substances from Marine Fishes, Shrimps, and Algae and Their Functions: Present and Future. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 8, p. 1114–1136, 2015.

ZAJAC, A. et al. Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 134, p. 114–120, 2015.

ZAWADZKI, J.; KACZMAREK, H. Thermal treatment of chitosan in various conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 2, p. 394–400, 2010.

ZHAN, J. et al. Selection and characterization of eight freshwater green algae strains

for synchronous water purification and lipid production. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 10, n. 3, p. 548–558, 2016.

ZHANG, K. et al. FT Raman investigation of novel chitosan sulfates exhibiting osteogenic capacity. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 60–65, 2011.

ZHANG, Q. et al. Three-Dimensional Spheroid Culture of Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells Enhances Mitigation of Chemotherapy-Induced Oral Mucositis. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 6, p. 937–947, 2012.

ZHAO, L.; W.U, Y.; CHEN, S.; XING, T. Preparation and characterization of cross-linked carboxymethyl chitin porous membrane scaffold for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, p. 150–155, 2015.

ZHAO, S. et al. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells and Their Therapeutic Consequences for Immune-Mediated Disorders. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 5, p. 607–614, 2010.

ZHOU, Y. et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis *in vivo* and *in vitro*. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 2, p. 34-47, 2013.

ZHU, W. et al. Hypoxia and Serum Deprivation-Induced Apoptosis in Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 2, p. 416–425, 2006.

ZOHORA, F. T.; AZIM, A. Y. M. A. Biomaterials As Porous Scaffolds for Tissue Engineering Applications: a Review. **European Scientific Journal**, v. 10, n. 21, p. 186–210, 2014.

ZUBER, M.; ZIA, K. M.; BARIKANI, M. Chitin and Chitosan Based Blends, Composites and Nanocomposites. Em THOMAS, S. et al. **Advances in Natural Polymer**, Springer Science, Berlin, 2013.

ZUBIA, M.; PAYRI, C.; DESLANDES, E. Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia). **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 6, p. 1033–1043, 2008.

ZUK, P. A. et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 4279–4295, 2002.

APÊNDICE A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS COM APLICAÇÕES NA MEDICINA REGENERATIVA UTILIZANDO QUITOSANA E POLISSACARÍDEOS DE ALGAS VERDES DO GÊNERO *GAYRALIA*

Pesquisador: MIGUEL DANIEL NOSEDA

Área Temática: Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País;

Versão: 3

CAAE: 54273916.5.0000.0102

Instituição Proponente: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.759.702

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos denominados "apresentação do projeto", "objetivos" e "avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_745489_E1.pdf".

INTRODUÇÃO

Milhares de pessoas são afetadas diariamente devido a injúrias causadas por doenças ou traumas, resultando na necessidade de transplantes ou de próteses. Atualmente, são cerca de 122,5 mil pessoas no mundo que estão na fila de espera por algum tipo de órgão ou tecido para o transplante, sendo que 26% são pacientes brasileiros. Mesmo com a progressão da ciência no desenvolvimento de novas tecnologias, existe ainda muita dificuldade de se realizar o transplante para certos tipos de órgãos ou tecidos, seja pela indisponibilidade nos bancos de doação, ou pela incompatibilidade do doador com o receptor. Neste aspecto, a medicina regenerativa é um ramo emergente da medicina, com aplicações voltadas para a reparação e a substituição ou regeneração de células, tecidos ou órgãos danificados. É uma área interdisciplinar que utiliza a combinação de diferentes abordagens, incluindo o uso de moléculas solúveis, terapia genética, transplante de células-tronco, engenharia de tecidos, bem como a reprogramação de células e tecidos.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.759.702

A engenharia de tecidos, em especial, vem demonstrando resultados promissores na medicina reabilitacional. É uma área multidisciplinar que envolve a combinação de conhecimentos da engenharia, ciência da vida e de materiais, com o intuito de produzir tecidos funcionais e órgãos bioartificiais. Quanto ao desenvolvimento de biomateriais para a engenharia de tecidos, diversos estudos têm sido feitos a fim de descobrir moléculas que proporcionem um conjunto ideal, e que apresentem características semelhantes ao do tecido ou órgão em estudo. Para a seleção do material, critérios como a biocompatibilidade, bioestabilidade, biodegradabilidade, propriedades da superfície, o design higiênico, a transferência de massa, a toxicologia, o custo, e outras propriedades físicas, químicas e biológicas determinam o potencial do biomaterial.

Visto que a maior parte dos objetos envolvendo a sociedade atual é proveniente de matérias-primas não renováveis, e tendo conhecimento do seu uso futuro limitado, a necessidade pela descoberta e criação de novas moléculas biorenováveis tem sido cada vez mais imposta pela sociedade atual. As algas estão presentes em abundância no meio ambiente, e têm grande importância no encadeamento do nosso ecossistema, principalmente como organismos fotossintetizantes e como fixadores de nitrogênio. Muitos desses compostos já vêm tendo larga aplicação nas indústrias química e alimentícia, entretanto, na indústria biomédica, esses recursos, de uma forma geral, ainda estão em fase inicial de pesquisas. Neste sentido, tem-se a necessidade de aprofundar os estudos em moléculas naturais que apresentem características físico-químicas, biocompatíveis e com atividades biológicas significativas para a indústria biomédica.

Na literatura atual, não existe nenhuma descrição do desenvolvimento de biomateriais a partir dos polissacarídeos heteroramnanas e quitosana. Visto que esses polissacarídeos apresentam alta atividade biológica e são biocompatíveis, o presente trabalho visa desenvolver biomateriais para a engenharia de tecidos, a partir de polissacarídeos oriundos de algas verdes, especificamente heteroramnanas sulfatadas provenientes de espécies do gênero *Gayralia*. A capacidade físico-química e biológica que essas moléculas apresentam como biomateriais será analisada através de experimentos *in vitro*, onde será explorada a interação com células potentes, como as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano.

HIPÓTESES

1. A primeira hipótese a ser testada será com relação ao desenvolvimento de um biomaterial a partir dos polissacarídeos heteroramnanas e quitosana.

Nesta primeira etapa, serão realizados testes em diferentes condições, para analisar a capacidade de formação de membranas e para avaliar suas características.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.759.702

2. A segunda hipótese a ser testada será com relação à capacidade de adesão, de proliferação e de diferenciação de células-tronco mesenquimais, provenientes do tecido adiposo humano quando cultivadas no biomaterial desenvolvido.

Conforme os resultados obtidos nesta etapa, será possível estabelecer com maior precisão a potencial aplicabilidade do biomaterial desenvolvido.

METODOLOGIA

A primeira etapa do projeto consistirá na obtenção das amostras de heterorramnanas sulfatadas, seguindo o protocolo previamente definido por Cassolato e colaboradores (2008). A quitosana (75% desacetilada) será obtida comercialmente (Sigma Aldrich).

A segunda etapa será o desenvolvimento do biomaterial. A preparação do biomaterial será realizada a partir da condensação iônica reversível entre os polissacarídeos de cargas opostas, formando-se um complexo polieletrólito (CPE). Para que a reação de condensação iônica ocorra, é necessário que os polissacarídeos estejam solubilizados em meio aquoso. As heterorramnanas são solúveis em água e em condições neutras de pH. A quitosana é solúvel em condições ácidas específicas de pH. Após a obtenção dos polissacarídeos devidamente solubilizados, será possível realizar a reação de condensação iônica reversível, através da agitação constante entre os polissacarídeos em condições específicas. Nesta etapa, serão desenvolvidos testes em diferentes condições (concentrações de polissacarídeos, pH e temperatura).

Na terceira etapa, será realizada a caracterização química do complexo polieletrólito formado. As análises serão feitas via ressonância magnética nuclear (RMN), utilizando o equipamento Bruker Advance III 600 (Bruker, Germany). Primeiramente, serão feitas análises de ¹H e ¹³C de cada polissacarídeo individualmente, e após a formação do complexo polieletrólito, uma nova análise será realizada. Na quarta etapa, serão analisadas as características físicas do CPE. Os aspectos morfológicos serão verificados via microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, utilizando o equipamento FEI Quanta 450 FEG e JEOL JEM 1200 EX-II, respectivamente.

Ainda na quarta etapa, serão verificadas as características mecânicas do biomaterial (elasticidade, resistência, ductilidade, fluência, dureza e tenacidade), através de diferentes análises que serão realizados em colaboração com outro laboratório (ainda não definido). Também será analisada a capacidade de absorção de fluidos do complexo polieletrólito. Esta análise será realizada de modo similar ao que Murakami e colaboradores (2010) desenvolveram em seu trabalho.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.759.702

Na quinta etapa será realizada a caracterização biológica do complexo polieletrólito formado. As análises serão realizadas através de experimentos *in vitro*, nos quais o biomaterial a ser testado será cultivado juntamente com células-tronco mesenquimais obtidas do tecido adiposo humano (CTM-TAU). Nesta etapa, será analisada a capacidade de adesão, proliferação e diferenciação dessas células no CPE por meio da microscopia óptica de fluorescência. As amostras de tecido adiposo serão provenientes de cirurgias plásticas de lipoaspiração. A utilização desse material biológico será feita somente com o consentimento dos pacientes, e será coletada pelos próprios cirurgiões em condições estéreis durante o procedimento cirúrgico. Os frascos contendo as amostras de tecido adiposo serão encaminhados em condições refrigeradas e estéreis ao laboratório de cultivo celular do Instituto Pelé Pequeno Príncipe, onde será realizado o procedimento para a extração de células-tronco mesenquimais. Essas células serão cultivadas e armazenadas em nitrogênio líquido, e serão testadas conforme o desenvolvimento dos biomateriais. As células-tronco mesenquimais serão caracterizadas através da imunofenotipagem com marcadores específicos de superfície. Para as CTM-TAU, os marcadores que se apresentam positivos em sua superfície são o CD29, CD90, CD73, CD105 e CD44; e os negativos são CD34, CD45, CD14 e HLA-DR. O grau de citotoxicidade será analisado através dos experimentos de células viáveis e inviáveis durante o cultivo, utilizando o kit comercial live/dead (Sigma - Aldrich). Na quinta etapa, também serão feitas análises histológicas e imunohistoquímicas específicas.

CRITÉRIO DE INCLUSÃO

As informações aqui apresentadas foram retiradas do documento intitulado "ProjetoMestrado.pdf", postado na Plataforma Brasil em 15.03.2016.

1. Apenas serão utilizadas amostras de tecido adiposo de pacientes saudáveis.

CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

As informações apresentadas neste item foram retiradas do documento intitulado "ProjetoMestrado.pdf", postado na Plataforma Brasil em 15.03.2016.

1. A exclusão de amostras se dará quando apresentem algum tipo de contaminação que inviabilize sua utilização.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

Desenvolver um biomaterial para a medicina regenerativa, utilizando heterorramnanas provenientes

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.759.702

de algas verdes do genero *Gayralia* com a quitosana.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

1. Testar diferentes condições (pH, concentração de polissacarídeo, solvente, temperatura) para determinar o desenvolvimento do biomaterial que apresente as melhores condições físico-químicas e biológicas, que serão avaliados conforme análises desenvolvidas no decorrer do projeto;
2. Determinar a estrutura química do biomaterial formado através de análises de ressonância magnética nuclear (RMN);
3. Determinar a estrutura morfológica do biomaterial formado através de análises de microscopia eletrônica (varredura e transmissão);
4. Verificar a capacidade de adesão e de proliferação de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano (CTM-TAU) no biomaterial, através de experimentos *in vitro*;
5. Determinar a diferenciação que as CTM-TAU adquirem após o cultivo destas com o biomaterial desenvolvido.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Com relação a riscos relacionados diretamente ao estudo são: a quebra de confidencialidade e a perda do tecido adiposo devido a contaminações, este último podendo ser provocado devido à má manipulação da amostra durante o processo cirúrgico ou no cultivo celular. A quebra de confidencialidade será prevenida através da seguinte medida: apenas o cirurgião responsável pela cirurgia de lipoaspiração terá conhecimento da identidade do doador.

Com relação à perda do tecido adiposo devido à contaminação, serão tomados todos os cuidados necessários para diminuir ao máximo esta possibilidade, tais como: manipulação da amostra em câmaras de fluxo estéreis, o uso de materiais devidamente tratados e esterilizados, assim como o uso de EPI's (Equipamentos de Proteção Individual).

BENEFÍCIOS

O principal benefício esperado com essa pesquisa é o avanço científico no desenvolvimento de novos biomateriais a partir de moléculas biorrenováveis, e que poderão vir a ser uma potencial ferramenta para a engenharia de tecidos e órgãos bioartificiais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

EMENDA 01

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.759.702

Essa pesquisa tem como objetivo principal o desenvolvimento de um biomaterial para a medicina regenerativa, utilizando heteroramnanas provenientes de algas verdes do gênero *Gayralia* com a quitosana. Na engenharia de tecidos já existem estudos que utilizam polissacarídeos de algas para a produção de hidrogéis/biofilmes. Os estudos desenvolvidos até o momento envolvem polissacarídeos simples, que apresentam uma estrutura repetitiva de unidades monossacarídicas, como os provenientes de algas. Em compensação, a produção de hidrogéis ou biofilmes utilizando polissacarídeos complexos como as heteroramnanas ainda é uma área a ser investigada, reforçando o ineditismo e a relevância científica do projeto.

Na literatura atual, não existe nenhuma descrição sobre a capacidade que as heteroramnanas têm sobre a diferenciação de células-tronco mesenquimais. Por outro lado, a quitosana, por ser um polissacarídeo mais estudado, já foi muito citada em pesquisas que demonstram seu efeito na diferenciação de células-tronco em células do tecido ósseo. No entanto, ainda não existe nenhum estudo evidenciando a capacidade de adesão, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais quando associada a uma heteroramnana.

O projeto original não tramitou na Conep, por não apresentar nenhuma área especial selecionada (de acordo à Resolução CNS nº 466, de 2012, item IX.4), como pode ser observado no arquivo "PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_1573481.pdf", gerado na Plataforma Brasil em 03.06.2016, referente à aprovação do Projeto Original/Inicial. Para esta emenda, entretanto, foi selecionada uma área temática especial ("equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no país"), sendo, portanto, necessária a apreciação ética do protocolo por essa Comissão.

Nesse sentido, a presente emenda se refere à inclusão de centro coparticipante. As informações sobre as alterações feitas nessa emenda se encontram nos arquivos intitulados "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_745489_E1.pdf", "Evangelico.pdf" e "Emenda.pdf".

CENTRO COPARTICIPANTE INCLUÍDO (conforme "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_745489_E1.pdf"):

1. Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba

Nome do Responsável: Maurus Vinicius Stier Serpe

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conept@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.759.702

LISTA ATUALIZADA DE CENTROS PARTICIPANTES E PESQUISADORES (conforme "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_745489_E1.pdf"):

1. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Federal do Paraná

Nome do Responsável: Miguel Daniel Nosedá

2. Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba

Nome do Responsável: Maurus Vinicius Stier Serpe

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

1. No arquivo intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_679660.pdf", gerado em 30.04.2016, consta que a "Associação Hospitalar de Proteção à Infância Dr. Raul Carneiro", sob responsabilidade da Dr^a Ety Forte Carneiro, constituía-se como um dos Centros Coparticipantes dessa pesquisa. No entanto, no arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_745489_E1.pdf", referente à presente emenda, a mesma instituição consta como "Desvinculada do projeto". Solicitam-se esclarecimentos e apresentação dos documentos referentes à exclusão de centro participante, conforme Ofício Circular CNS nº 062 de 2011.

2. Sobre o arquivo intitulado "TCLEModificado16maio2016.docx", postado na Plataforma Brasil em 17.05.2016:

2.1. Solicita-se esclarecer/simplificar ao participante da pesquisa o significado de alguns termos, como biomateriais, células-tronco, lipoaspiração e biorrenováveis (Resolução CNS nº 466 de 2012, item II.23).

2.2. Solicita-se incluir texto assegurando, de forma clara e afirmativa, que o participante de pesquisa receberá a assistência integral e imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrentes da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.6 e V.6).

2.3. Solicita-se incluir texto garantindo ao participante da pesquisa o direito de requerer indenização, caso seja necessário (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens IV.3 e V.7; e Código Civil,

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.750.702

Lei 10.406 de 2002, artigos 927 a 954, Capítulos I, "Da Obrigação de Indenizar", e II, "Da Indenização", Título IX, "Da Responsabilidade Civil").

2.4. Solicita-se substituir o termo "doação"/"doador"/"doar" por "cessão"/"cedente"/"ceder", uma vez que o material biológico humano coletado continuará pertencendo ao participante da pesquisa, permanecendo apenas sua guarda sob a responsabilidade institucional do pesquisador (Resolução CNS nº 441 de 2011, itens 9 e 9.I).

2.5. Solicita-se inserir endereço, e-mail e telefone da Conep (Resolução CNS nº 466, de 2012, item IV.5.d).

2.6. Solicita-se que seja informado que o TCLE será elaborado em duas vias, sendo uma retida com o pesquisador responsável e outra com o participante de pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens IV.3.f e IV.5.d).

2.7. De forma a garantir sua integridade, o documento deve apresentar a numeração das páginas. Solicita-se que esta seja inserida de forma a indicar o número total de páginas, por exemplo: 1 de 3; 2 de 3; e 3 de 3.

3. O cronograma de execução deve apontar o início do estudo em data compatível com a tramitação do protocolo no Sistema CEP/Conep. Deve-se apresentar compromisso explícito de iniciar o estudo somente após a aprovação final do Sistema CEP/Conep. Além do mais, todas as etapas da pesquisa devem estar discriminadas no cronograma (Norma Operacional CNS nº 001, de 2013, item 3.4.1.9). Solicita-se adequação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Uma vez que não se trata de área temática especial da CONEP, essa Comissão decide devolver com recomendações. Favor verificar campo "Recomendações".

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep - delibera pela devolução do protocolo de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP, por não se enquadrar em nenhuma das áreas temáticas descritas no item IX.4 da Resolução CNS nº 466 de 2012.

Portanto, esta comissão delibera por devolver o protocolo em questão, solicitando a esse Comitê que acompanhe o atendimento às questões acima e informando que após análise e

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.759.702

aprovação do CEP o estudo pode ser iniciado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_745489_E1.pdf	03/08/2016 11:01:44		Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Evangelico.pdf	03/08/2016 10:58:23	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Declaração de Pesquisadores	Emenda.pdf	03/08/2016 10:54:56	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEModificado16maio2016.docx	17/05/2016 08:37:25	IDA CRISTINA GUBERT	Acelto
Outros	CartaAnuenciaClinica.jpg	30/04/2016 19:22:38	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Outros	CartaAnuenciaMedico.jpg	30/04/2016 19:21:42	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Outros	CorrecaoPendencias.pdf	30/04/2016 19:16:38	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeConsentimentoLivreeEsclarecidoModificado.docx	30/04/2016 16:19:26	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoMestrado.pdf	15/03/2016 15:31:27	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AvaliacaoParecerista.pdf	15/03/2016 15:27:24	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnalisedoMeritoCientifico.pdf	15/03/2016 15:25:53	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	EncaminhamentodaAta.pdf	15/03/2016 15:24:41	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ExtratodaAta.pdf	15/03/2016 15:23:57	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Declaração de Pesquisadores	OficiodeEncaminhamentodeProjetoaoCEP.pdf	15/03/2016 15:22:05	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento /	TermodeConsentimentoLivreeEsclarecido.docx	15/03/2016 15:20:05	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.759.702

Justificativa de Ausência	TermodeConsentimentoLivreeEsclarecido.docx	15/03/2016 15:20:05	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Declaração de Pesquisadores	TermodeCompromissodeIniciodePesquisa.pdf	15/03/2016 15:19:25	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Declaração de Pesquisadores	TermodeConfidencialidade.pdf	15/03/2016 15:14:27	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaodeTomarPublicoosResultados.pdf	15/03/2016 15:13:01	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoOrientacaoPos.pdf	15/03/2016 15:05:17	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DeclaracaodeUsoEspecificodeMaterial.pdf	15/03/2016 15:02:44	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ConcordanciaInstituicaoCoparticipante.pdf	15/03/2016 15:01:32	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ConcordanciadosServicosEnvolvidos.pdf	15/03/2016 14:59:34	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	15/03/2016 14:51:01	MIGUEL DANIEL NOSEDA	Acelto

Situação do Parecer:
Devolvido com Recomendação

BRASILIA, 05 de Outubro de 2016

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conepe@saude.gov.br

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TLCE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido | TCLE

Nós, Professor Dr. Miguel Daniel Nosedá e a pós-graduanda Elori Mieko Oikawa da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o/a Senhor/Senhora paciente, a doar o tecido adiposo (gordura) retirado na cirurgia de lipoaspiração para que possa ser utilizado na pesquisa científica intitulada “Desenvolvimento de Biomateriais com Aplicações na Medicina Regenerativa utilizando quitosana e polissacarídeos de Algas Verdes do gênero *Gayralia*”. A justificativa do projeto de pesquisa está relacionada com a necessidade de desenvolver biomateriais a partir de fontes renováveis como os carboidratos (polissacarídeos), para que possam ser utilizados na diferenciação de células-tronco, na área da medicina regenerativa.

- a) O objetivo desta pesquisa é desenvolver biomateriais a partir de carboidratos com aplicações na medicina regenerativa, e testar o biomaterial desenvolvido com células-tronco obtidas a partir do tecido adiposo (gordura) do paciente.
- b) Caso o/a Sr./Sra. aceite doar para esta pesquisa a gordura retirada na cirurgia de lipoaspiração, é necessário o seu consentimento sobre a doação deste material. Se houver consentimento através deste termo, a gordura retirada na cirurgia será armazenada em frascos esterilizados. Estes frascos, contendo a gordura, serão encaminhados ao laboratório de cultivo celular do Instituto Pelé Pequeno Príncipe, onde será realizado o procedimento para a extração de células-tronco mesenquimais. Essas células serão cultivadas, armazenadas e testadas nos biomateriais desenvolvidos.
- c) Esta coleta será realizada quando o paciente estiver no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba – Departamento de Cirurgia Plástica e Queimados na Rua Alameda Augusto Stelfeld, 1908, CEP 80730-150, Curitiba, Paraná, Brasil, onde serão realizadas as consultas médicas, os pré-exames necessários para o procedimento cirúrgico e o próprio processo cirúrgico. Neste mesmo local, o médico irá apresentar a proposta de doação do tecido adiposo (gordura) que será retirado durante a cirurgia de lipoaspiração. Se estiver de acordo com a proposta, será necessária a leitura e assinatura deste termo de consentimento, o que levará aproximadamente 15 (quinze) minutos.
- d) Considerando que o material doado será aquele retirado na cirurgia de lipoaspiração, não é esperado nenhum tipo de risco adicional com a doação do tecido adiposo (gordura). Apenas o cirurgião responsável pela cirurgia de lipoaspiração terá conhecimento da identidade do doador; as amostras doadas serão tratadas com códigos para que não haja correlação e identificação do paciente doador.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Setor de Ciências da
Saúde/UFRP.
Parecer CEP/SD-PB nº 1689/353
na data de 22/08/2016

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal:
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE:
Orientador:

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR |
CEP/SD Rua Padre Camargo, 285 | térreo | Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 |
cometica.saude@ufpr.br - telefone (041) 3360-7259

- e) O principal benefício esperado com essa pesquisa é o avanço científico no desenvolvimento de novos biomateriais a partir de moléculas biorrenováveis, e que poderão vir a ser uma potencial ferramenta para a engenharia de tecidos e órgãos bioartificiais.
- f) Os pesquisadores Professor Dr. Miguel Daniel Nosedá e a aluna de mestrado Elori Mieko Oikawa, responsáveis por este estudo poderão ser localizados na Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, na Sala 253 e Laboratório 248, respectivamente. Também poderão ser contatados via e-mail mdn@ufpr.br e elormieko@hotmail.com, ou telefone fixo (41) 3361-1663 e (41) 3361-1579, no horário comercial (9:00-18:00) para esclarecer eventuais dúvidas que o/a Sr./Sra. possa ter e fornecer-lhe as informações solicitadas, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.
- g) A doação do tecido adiposo (gordura) retirado na cirurgia de lipoaspiração é voluntária e se o/a Sr./Sra. não quiser que o material doado faça parte da pesquisa, poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe seja devolvido este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado. Também será feito o descarte apropriado das amostras e as informações serão desconsideradas.
- h) As informações relacionadas ao estudo serão conhecidas por pessoas autorizadas, no caso o Professor orientador Dr. Miguel Daniel Nosedá, as Professoras co-orientadoras, Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá e Dra. Katherine Athayde Teixeira de Carvalho e a mestrande Elori Mieko Oikawa. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a identidade do paciente seja preservada e mantida sua confidencialidade.
- i) O material doado, tecido adiposo (gordura), será utilizado para essa pesquisa, no período determinado entre 01/06/2016 à 30/04/2017. Após este período, as amostras serão devidamente descartadas.
- j) As despesas necessárias para a realização da pesquisa referente ao transporte do tecido adiposo, extração, cultivo e manutenção das células-tronco, assim como as análises com o biomaterial não são de sua responsabilidade e o/a Sr./Sra. não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.
- k) Quando os resultados forem publicados, o nome do paciente não será divulgado.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Setor de Ciências da
Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB nº 1689.353
na data de 22/08/2016

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal:
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE:
Orientador:

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR |
CEP/SD Rua Padre Camargo, 285 | térreo | Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 |
cometica.saude@ufpr.br - telefone (041) 3360-7259

- l) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como contribuinte na pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo para o qual concordei com a doação do tecido adiposo que será retirado na cirurgia de lipoaspiração. Eu entendi que sou livre para interromper minha doação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim. Eu concordo voluntariamente em doar o tecido adiposo produto da cirurgia de lipoaspiração.

Curitiba, ____ de _____ de 2016

Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal

Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Setor de Ciências da
Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB.nº 1689353
na data de 22/08/2016

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal:
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE:
Orientador:

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR |
CEP/SD Rua Padre Camargo, 285 | térreo | Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 |
cometica.saude@ufpr.br - telefone (041) 3360-7259